



Adriana dos Santos Falcão

Licenciatura em Bioquímica

**Agregação e formação de amilóides por
proteínas neuroinflamatórias S100A8 e
S100A9 e implicações em processos
neurodegenerativos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Doutor Cláudio M. Gomes, FCUL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro
Arguente: Prof. Doutora Patrícia Ferreira Neves Faisca
Vogal: Prof. Doutor Cláudio Emanuel Moreira Gomes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2015

LOMBADA

2015

**Agregação e formação de amilóides por proteínas neuroinflamatórias S100A8 e S100A9 e
implicações em processos neurodegenerativos**
Adriana Falcão





Adriana dos Santos Falcão

Licenciatura em Bioquímica

**Agregação e formação de amilóides por
proteínas neuroinflamatórias S100A8 e
S100A9 e implicações em processos
neurodegenerativos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Doutor Cláudio M. Gomes, FCUL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro
Arguente: Prof. Doutora Patrícia Ferreira Neves Faisca
Vogal: Prof. Doutor Cláudio Emanuel Moreira Gomes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2015

Copyright Adriana dos Santos Falcão, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar o meu agradecimento a todos os que me acompanharam ao longo deste trabalho:

Primeiramente, ao meu orientador, Doutor Cláudio Gomes, pela oportunidade de aprendizagem e conhecimento científico. Agradeço por exigir sempre o melhor, pelo incentivo, pelas críticas e pela constante motivação.

À Joana Cristóvão, por me orientar e ajudar ao longo de todo o trabalho, pela disponibilidade, por me desafiar, pelas críticas construtivas e principalmente pela paciência demonstrada ao longo do percurso.

À Tânia Lucas, Bárbara Henriques e Sónia Leal, colegas e amigas do grupo *Protein folding and misfolding*, por todos os bons momentos partilhados, por me integrarem e permitirem um ótimo ambiente de trabalho. Agradeço por toda a disponibilidade, apoio e partilha de conhecimento.

Aos meus amigos, pelo apoio e incentivo ao longo do trabalho, pelos momentos de distração e pela amizade. Em especial, à minha amiga Tânia Custódio, pela companhia, pelo companheirismo e amizade, pelas horas de desabafos, pelos conselhos e motivação.

Por fim, à minha família, aos meus pais e irmã por acreditarem sempre em mim, pelo carinho, incentivo e dedicação. Obrigada por tudo.

RESUMO

Uma característica comum a muitas doenças neurodegenerativas é a formação de agregados proteicos e amilóides, no que se designa a cascata amiloide. O foco deste trabalho é o estudo do homodímero S100A9 e do heterodímero S100A8/A9, duas das proteínas da resposta neuroinflamatória, que se encontram elevadas na vizinhança de depósitos proteicos, nomeadamente na doença de Alzheimer. Estas proteínas pertencem à família das S100, que possuem dois domínios *EF-hand* de ligação a Ca^{2+} , e ligam também cobre e zinco. Este estudo visa contribuir esclarecer se as proteínas S100A8 e S100A9 estarão envolvidas na cascata de agregação amiloide, por formação direta de agregados das S100, ou mediante a associação com iões metálicos, cuja disfunção é característica em doenças neurodegenerativas.

O primeiro passo do trabalho consistiu em expressar e purificar a S100A9 e a S100A8/A9, otimizando o processo. Os estudos de estabilidade térmica na presença e ausência de Ca^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , revelaram que a S100A8/A9 é termodinamicamente mais estável que a S100A9. Os três iões metálicos são destabilizadores da S100A9, diminuindo a sua estabilidade térmica. Para a estabilidade térmica da S100A8/A9 os mesmos iões não mostraram ter um efeito significativo, pelo que se sugere uma conformação diferente com o core hidrofóbico mais blindado, aumentando a estabilidade. Realizaram-se também ensaios cinéticos de agregação, que revelaram que a S100A9 apresenta uma agregação heterogénea, não dependente de nucleação na presença dos metais. No caso da S100A8/A9, os três iões metálicos potenciam a agregação. Por fim, analisou-se a hipótese de S100A9 e S100A8/A9 como moduladores de agregação do péptido $\text{A}\beta_{1-42}$. O $\text{A}\beta_{1-42}$ mostrou ter influência na agregação da S100A9 e da S100A8/A9, podendo estas proteínas ser potenciadoras da agregação. Este trabalho revelou que a agregação das proteínas em estudo é influenciada e potenciada pela ligação dos iões metálicos, pelo que se sugere que estes tenham um papel crucial na formação de agregados de S100A8/A9 e de S100A9.

Palavras-chave: S100A9, S100A8/A9, agregação proteica, iões metálicos, doença de Alzheimer

SUMMARY

The formation of proteic and amyloid aggregates, designated as amyloid cascade, is a common feature of many neurodegenerative diseases. The focus of this work is to study the homodimer S100A9 and the heterodimer S100A8/A9, two proteins of the neuroinflammatory response, found at high levels in the neighborhood of protein deposits, particularly in Alzheimer's disease. The S100A8 and S100A9 proteins belong to the S100 family, which have two EF-hand Ca^{2+} binding domains that can also bind copper and zinc. This study aims to clarify whether the S100A8 and S100A9 proteins are involved in the cascade of amyloid aggregation, by direct formation of S100 aggregates, or by association with metal ions, whose dysfunction is characteristic of neurodegenerative diseases.

The first step of this work was to express and purify the S100A9 and S100A8/A9, while optimizing the process. The thermal stability studies in the presence and absence of Ca^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} , revealed that S100A8/A9 is thermodynamically more stable than the S100A9. All metal ions destabilize S100A9, decreasing its thermal stability. For the thermal stability of S100A8/A9 the same ions showed to have no significant effect, suggesting a different conformation with more shielded hydrophobic core, and increasing its stability. The kinetic assays of aggregation, revealed that S100A9 has a heterogeneous aggregation in the presence of metals, independent of nucleation. In the case of S100A8/A9, the three metal ions potentiate aggregation. Finally, we examined the hypothesis of S100A9 and S100A8/A9 as modulators of $\text{A}\beta_{1-42}$ peptide aggregation. The $\text{A}\beta_{1-42}$ was shown to have influence on the aggregation of S100A9 and S100A8/A9, thus these proteins may be aggregation enhancers. This work has shown that aggregation of the studied proteins are influenced and enhanced by the binding of metal ions, whereby it is suggested that the metal ions have a crucial role in the formation of aggregates S100A8/A9 and S100A9.

Keywords: S100A9, S100A8/A9, proteic aggregation, metal ions, Alzheimer's disease

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ABREVIATURAS.....	xiii
1.1 <i>Folding</i> de proteínas e misfolding	1
1.1.1 Folding proteico	1
1.1.2 Regulação do <i>folding</i> proteico.....	4
1.1.3 Agregação proteica e formação de amilóides.....	5
1.1.3 Doenças de <i>folding</i> proteico	11
1.2 Métodos de análise estrutural e estabilidade	14
1.2.1 Métodos biofísicos para monitorização do folding proteico	14
1.2.1.1. Espetroscopia de fluorescência	15
1.2.1.2. Espetroscopia de varrimento diferencial (DSF)	15
1.3. Proteínas S100.....	17
1.3.1 Caraterísticas estruturais gerais das S100	17
1.3.2. Associação dos iões metálicos às proteínas S100	18
1.3.3. Principais funções das proteínas S100.....	20
1.3.4 Proteínas S100A8 e S100A9: caraterísticas gerais e funções	22
1.3.5 As proteínas S100A8 e S100A9 associadas à doença de Alzheimer	24
Objetivo do trabalho	28
II. MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1 Expressão e purificação proteica	29
2.1.1 Expressão e purificação dos homodímeros S100A9 e S100A8	29
2.1.2. Expressão e purificação do heterodímero S100A8/A9	30
2.1.3. Método de obtenção da forma desmetalada (forma apo) das proteínas S100	30
2.1.4. Expressão e purificação do péptido A β ₄₂	30
2.2. Método de análise da estrutura secundária e estabilidade.....	31
2.3. Método de análise de estabilidade.....	31
2.4. Ensaio de cinéticas de agregação.....	32
III- RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1 Purificação das proteínas S100A8 e S100A9	33
3.1.2. Purificação do heterodímero S100A8/A9.....	35
3.2 Purificação do péptido A β ₁₋₄₂	37
3.3 Efeito dos iões metálicos na estrutura e estabilidade das proteínas S100A9 e S100A8/A9	38
3.3.1 Efeito dos iões metálicos na estrutura e estabilidade da S100A9	38
3.3.2 Efeito dos iões metálicos na estrutura e estabilidade da S100A8/A9.....	42
3.4 Análise da cinética de agregação das proteínas S100A9 e do heterodímero S100A8/A9 em função do tempo.....	46
3.4.1 Efeito dos iões metálicos na cinética de agregação do homodímero S100A9.....	47

3.4.2 Efeito dos iões metálicos na cinética de agregação do heterodímero S100A8/A9	51
3.5 Efeito do homodímero S100A9 e do heterodímero S100A8/A9 na agregação do péptido $A\beta_{1-42}$	56
3.5.1 Efeito do homodímero S100A9 na cinética de agregação do péptido $A\beta_{1-42}$	56
3.5.2 Efeito do heterodímero S100A8/A9 na cinética de agregação do péptido $A\beta_{1-42}$	57
V. BIBLIOGRAFIA	62
VI. ANEXOS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Representação das ligações e interações presentes na estrutura tridimensional das proteínas.....	2
Figura 1.2: Esquema representativo do modelo do funil energético do folding proteico.	3
Figura 1.3: Ilustração da regulação do folding proteico no retículo endoplasmático.....	5
Figura 1.4: Possíveis tipos de conformações adotadas pelas proteínas a partir do estado nativo.	6
Figura 1.5: Modelo energético do folding proteico e agregação	7
Figura 1.6: Representação da formação de fibras.....	8
Figura 1.7: Termodinâmica do estado amilóide	8
Figura 1.8: Fibrilas amilóides e esquema representativo da sua constituição	9
Figura 1.9: Curva sigmoidal de formação de fibras amilóides	9
Figura 1.10: Representação das diferentes vias de nucleação no processo de agregação	10
Figura 1.11: Mecanismos de defesa celular contra agregados proteicos.....	11
Figura 1.12: Lesões neuropatológicas de doenças neurodegenerativas.	12
Figura 1.13: Representação de uma curva hipotética de desnaturação em função da temperatura.	14
Figura 1.14: Curva típica de uma desnaturação térmica por DSF.....	16
Figura 1.15: Cinética da formação de agregados em função do tempo, usando um fluoróforo.	16
Figura 1.16: Estrutura 3D dos motivos EF-hand das proteínas S100	17
Figura 1.17: Representação do alinhamento de um monômero de S100.	18
Figura 1.18: Estrutura 3D de uma proteína S100 ligada com Ca^{2+} e Zn^{2+}	19
Figura 1.19: Esquema representativo da formação de agregados amilóides de proteínas S100 na presença de íons metálicos. Adaptado de [40].	20

Figura 1.20: Representação do alinhamento da sequência de aminoácidos da S100A8 e S100A9. A amarelo os resíduos conservados que ligam Ca^{2+} .	22
Figura 1.21: Representação terciária dos homodímeros S100A8 e S100A9 e duas projeções do heterodímero S100A8/A9.	22
Figura 1.22: Representação de um possível ciclo de feedback positivo envolvendo as proteínas S100 de perpetuação da inflamação crônica.	23
Figura 1.23: Esquema representativo dos microtúbulos e da polimerização dos mesmos.	24
Figura 1.24: Representação das áreas do cérebro afetadas na doença de Alzheimer.	25
Figura 1.25: Representação dos mecanismos, normal e anormal, de clivagem da proteína precursora amiloide (APP).	25
Figura 1.26: Esquema ilustrativo de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares.	26
Figura 1.27: Esquema representativo do ciclo de formação de fibrilas amilóides na inflamação.	26
Figura 3.1: Purificação do homodímero S100A9.	33
Figura 3.2: Purificação do homodímero S100A9.	34
Figura 3.3: Purificação do heterodímero S100A8/A9.	36
Figura 3.4: Purificação do péptido $\text{A}\beta_{1-42}$.	37
Figura 3.5: Monitorização da desnaturação térmica do homodímero S100A9 na presença de várias concentrações de íons metálicos, por DSF.	40
Figura 3.6: Temperaturas de desnaturação do homodímero S100A9 na presença de várias concentrações dos íons metálicos.	40
Figura 3.7: Monitorização da desnaturação térmica do homodímero S100A9 na presença de dois íons metálicos em simultâneo, por DSF.	41
Figura 3.8: Temperaturas de desnaturação do homodímero S100A9 na presença de dois íons metálicos em simultâneo.	41
Figura 3.9: Monitorização da desnaturação térmica do heterodímero S100A8/A9 na presença de várias concentrações de íons metálicos, por DSF.	42

Figura 3.10: Temperaturas de desnaturação do heterodímero S100A8/A9 na presença de várias concentrações dos íões metálicos.....	43
Figura 3.11: Monitorização da desnaturação térmica do heterodímero S100A8/A9 na presença de dois íões metálicos em simultâneo, por DSF.	44
Figura 3.12: Temperaturas de desnaturação da S100A8/A9 na presença de dois íões metálicos em simultâneo.	44
Figura 3.13: Cinéticas de agregação do homodímero S100A9 na presença de várias concentrações dos íões metálicos	47
Figura 3.14: Cinética de agregação do homodímero S100A9 na presença de dois íões metálicos em simultâneo.	49
Figura 3.15: Cinética de agregação do homodímero S100A9 na presença de dois íões metálicos em simultâneo	50
Figura 3.16: Cinética de agregação do homodímero S100A9 na presença de dois íões metálicos em simultâneo	50
Figura 3.17: Cinética de agregação do heterodímero S100A8/A9 na presença de várias concentrações dos íões metálicos	51
Figura 3.18: Cinética de agregação do heterodímero S100A8/A9 na presença de dois íões metálicos em simultâneo	53
Figura 3.19: Cinética de agregação do heterodímero S100A8/A9 na presença de dois íões metálicos em simultâneo	53
Figura 3.20: Cinética de agregação do heterodímero S100A8/A9 na presença de dois íões metálicos em simultâneo	54
Figura 3.21: Cinéticas de agregação do homodímero S100A9 na presença do péptido A β ₁₋₄₂ 57	
Figura 3.22: Cinéticas de agregação do heterodímero S100A8/A9 na presença do péptido A β ₁₋₄₂	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Sumário de doenças neurodegenerativas: proteínas e patologia 13

Tabela 1. 2: Influência dos íons metálicos na oligomerização das proteínas S100 e as suas funções 18

Tabela 3.1: Rendimentos obtidos na purificação do homodímero S100A9 antes e após a otimização. 35

ABREVIATURAS

A β	Péptido amilóide-beta
AD	Doença de Alzheimer (do inglês <i>Alzheimer's disease</i>)
ANS	Ácido 8-anilinonaftaleno-1-sulfônico
APP	Proteína precursora amilóide (do inglês <i>amyloid precursor protein</i>)
CD	Dicroísmo circular (do inglês <i>circular dichroism</i>)
DO _{600nm}	Densidade ótica a 600 nm
DSF	Varrimento diferencial de fluorescência (do inglês <i>differential scanning fluorescence</i>)
DTT	Ditioreinol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetra-acético
ER	Retículo endoplasmático (do inglês <i>endoplasmatic reticulum</i>)
IPTG	Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo
MRP	Proteína relacionada mielóide (do inglês <i>Myeloid related protein</i>)
MT	Microtúbulos
NFT	Emaranhados neurofibrilares (do inglês <i>neurofibrillar tangles</i>)
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluorido
SDS-PAGE	Sódio Dodecil Sulfato - Gel Electroforese de Poliacrilamida
TEM	Microscopia de transmissão eletrônica (do inglês <i>transmission electron microscopy</i>)
TCEP	Tris-[2-carboxietil]-fosfina
Tlag	Tempo de lag phase
ThT	Tioflavina T (3,6 – dimetilbenzotiazol-2-il)-N,N dimetilanilina)
Tm	Temperatura de desnaturação
UV	Ultra violeta

I. INTRODUÇÃO

A introdução desta dissertação encontra-se dividida em três secções. A secção 1.1 aborda a biossíntese proteica e aspetos fundamentais do processo de *folding*. Apresentam-se os mecanismos de regulação do processo de *folding* das proteínas e aborda-se uma das consequências do *misfolding* das proteínas, a agregação proteica e doenças associadas a este fenómeno. Na secção 1.2 descrevem-se alguns métodos biofísicos que permitem estudar e monitorizar o *folding* proteico. Na secção 1.3 apresenta-se as proteínas S100, focando nas proteínas em estudo S100A8 e S100A9, e o seu papel em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer.

1.1 *Folding* de proteínas e *misfolding*

1.1.1 *Folding* proteico

A estrutura tridimensional nativa de uma proteína, determinada por interações moleculares é um pré-requisito para as suas funções e fundamental para todos os processos biológicos [1]. Um desafio importante na biologia molecular é o de encontrar os princípios que determinam o processo de obtenção da estrutura tridimensional e funcional a partir da cadeia polipeptídica, portanto, decifrar o processo de *folding* proteico [2, 3].

Nos últimos anos, tornou-se evidente que o *folding* e *misfolding* de proteínas está associado com uma vasta gama de processos celulares desde o transporte de moléculas para organelos específicos até à regulação do ciclo celular e à resposta imunitária [3, 4]. As proteínas corretamente enroladas são estáveis a longo prazo no ambiente biológico e são capazes de interagir seletivamente com os seus parceiros naturais [5].

As proteínas são sintetizadas por uma série de passos, nomeadamente a transcrição e tradução, sendo a sequência de aminoácidos a estrutura primária das proteínas. A conformação estrutural das cadeias polipeptídicas têm características distintas e correspondem à estrutura secundária das proteínas, e é dependente de ligações de hidrogénio. A estrutura terciária das proteínas, refere-se ao arranjo espacial dos elementos da estrutura secundária (tais como hélices- α , folhas- β e *loops*) que se formam a partir da sequência linear de aminoácidos. As cadeias polipeptídicas enrolam espontaneamente de modo a que a maioria das suas cadeias laterais hidrofóbicas estejam blindadas no interior e a maior parte das cadeias laterais polares, carregadas, estejam à superfície. Uma vez enroladas, a conformação tridimensional biologicamente ativa das proteínas é mantida não só por interações hidrofóbicas, mas também por forças eletrostáticas, ligações de hidrogénio e apresentam ligações covalentes de dissulfureto (Fig. 1.1) [6].

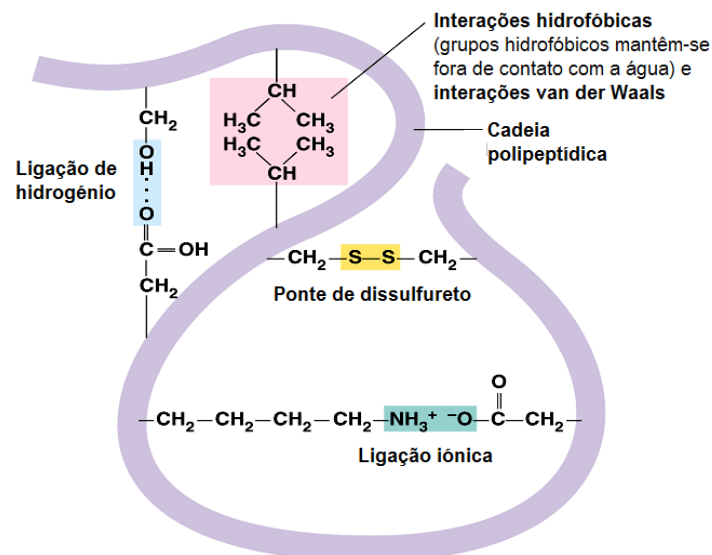


Figura 1.1: Representação das ligações e interações presentes na estrutura tridimensional das proteínas.

Algumas proteínas são também compostas por múltiplas cadeias polipeptídicas, normalmente referidas como subunidades da proteína. Estas subunidades podem ser iguais (como no caso dos homodímeros) ou diferentes (como por exemplo nos heterodímeros e complexos). A estrutura quaternária refere-se à forma como estas subunidades interagem umas em relação às outras e se arranjam num complexo proteico. A conformação final do complexo proteico é mais uma vez estabilizada por várias interações, incluindo pontes de hidrogénio [7].

O *folding* proteico é o processo físico a partir do qual uma cadeia polipeptídica adquire uma conformação tridimensional particular. O *folding* resulta do estabelecimento de uma gama de interações que são definidas pela composição da sequência primária da proteína. A conformação obtida no final do processo corresponde ao chamado estado nativo [8].

Em condições fisiológicas, o estado nativo e o estado desnaturado das proteínas estão em constante equilíbrio. O estado desnaturado apresenta uma elevada entropia conformacional, podendo adotar várias conformações.

O equilíbrio entre a forma nativa e a forma desnaturada pode ser descrito pela equação termodinâmica geral (Equação 1):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equação 1})$$

Onde ΔH representa a variação da energia livre, resultante de contribuições de ligações químicas e interações e $-T\Delta S$ representa a variação da energia livre, resultante de variações no grau de ordem dentro do sistema [8].

A energética do processo de *folding* proteico pode ser conceptualizada por um gráfico que representa a superfície de energia e que permite representar as variações de energia do sistema,

em função da organização tridimensional da estrutura proteica, até ao estado nativo, ao qual corresponde um mínimo energético (Fig. 1.2) [8, 9].

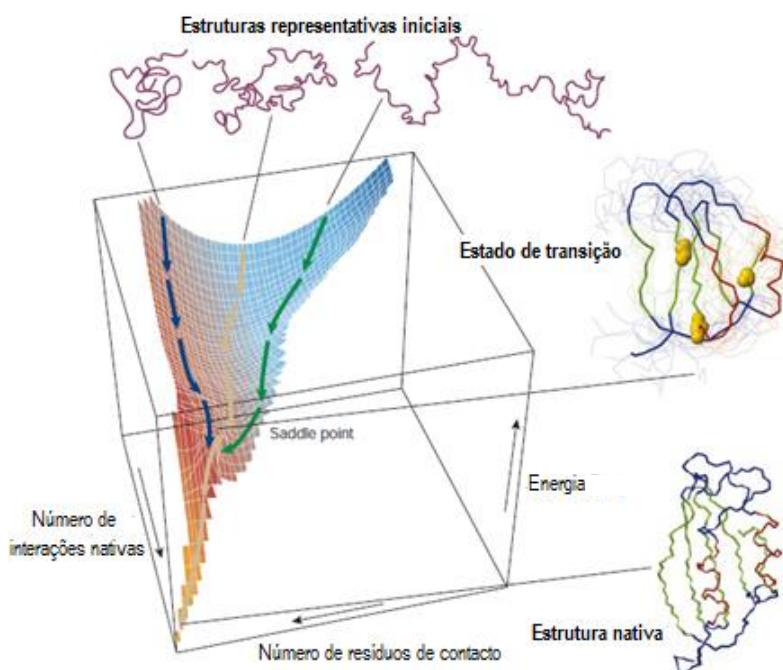


Figura 1.2: Esquema representativo do modelo do funil energético do folding proteico. Adaptado de [4].

Este modelo energético do *folding* de proteínas que envolve a organização progressiva de uma associação de estruturas parcialmente enroladas numa superfície de energia livre pode ser representada conceptualmente como um funil [9]. A extremidade superior do funil detém um amplo conjunto de conformações no estado desnaturado caracterizadas por uma elevada energia resultante de poucas interações que conduzem a uma grande entropia conformacional. Por outro lado, a conformação nativa encontra-se no final deste funil, num mínimo de energia alcançado como resultado de múltiplas interações electrostáticas de pequena magnitude e interações hidrofóbicas (Fig. 1.2) [8].

Dentro das células, as cadeias polipeptídicas nascentes são sequencialmente sintetizadas no ribossoma por um processo vetorial [2]. O *folding in vivo* é feito, nalguns casos, na co-tradução; ou seja iniciado antes da conclusão da síntese proteica, enquanto a cadeia nascente está ligada ao ribossoma. Outras proteínas, contudo, sofrem a maior parte do seu *folding* no citoplasma após serem libertadas do ribossoma, enquanto outras enrolam em compartimentos específicos, tais como em mitocôndrias ou no retículo endoplasmático (ER), após o transporte e translocação através da membrana. Os princípios físicos do processo de *folding* são universais. No entanto como as proteínas com *fold* incorreto expõem inevitavelmente ao solvente regiões da sua estrutura que estão normalmente blindadas no seu estado nativo, estas são propensas a

interações inapropriadas com outras moléculas dentro do ambiente celular. Os sistemas vivos desenvolveram uma gama de estratégias para prevenir tal comportamento [4].

1.1.2 Regulação do *folding* proteico

Muitas vezes o processo de *folding* pode ser complexo, pelo que seria notável se o *misfolding* de proteínas nunca ocorresse. Há evidências que são necessários chaperões moleculares para prevenir o *misfolding*. Os chaperões moleculares são definidos como qualquer proteína que interage com outra proteína, estabilizando-a, facilitando a aquisição da sua conformação funcional ativa, a sua associação oligomérica, transporte ou a sua disposição para a degradação, sem estar presente na sua estrutura final [10, 11].

Existem diferentes classes de chaperões que não estão estruturalmente relacionados, formando vias e redes cooperativas nas células. Os membros desta família de proteínas são conhecidos como proteínas de choque térmico (Hsp), uma vez que são regulados em condições de *stress* em que as concentrações de intermediários de agregação do *folding* aumentam. Os chaperões são normalmente classificados de acordo com o seu peso molecular (Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100...). Estão envolvidos numa variedade de funções de manutenção do proteoma, incluindo *folding* de novo, *refolding* de proteínas desnaturadas, associações oligoméricas, entre outras [11].

Alguns chaperões interagem com as cadeias nascentes desde que emergem do ribossoma, enquanto outros estão envolvidos na orientação de fases posteriores do processo de *folding*. Os chaperões moleculares frequentemente funcionam em conjunto para assegurar que as várias fases do *folding* de tais sistemas são completados de forma eficiente [4]. Os chaperões moleculares aumentam a eficiência do processo, em geral reduzindo a probabilidade de reações competitivas, particularmente o *misfolding*. No entanto, existem várias classes de catalisadores de *folding* que aceleram passos potencialmente lentos no processo de *folding* [4].

Nos sistemas eucariotas, muitas das proteínas que são sintetizadas na célula são destinadas à secreção para o meio extracelular. Estas proteínas são transportadas para o interior do retículo endoplasmático (ER), onde ocorre o *folding* antes da secreção através do complexo de Golgi. O ER contém uma gama ampla de chaperões moleculares e catalisadores de *folding*, e além disso as proteínas que estão numa conformação enrolada devem satisfazer os requisitos de controlo de qualidade antes de serem exportadas [4]. A figura 1.3 ilustra a regulação do processo de *folding* no retículo endoplasmático.

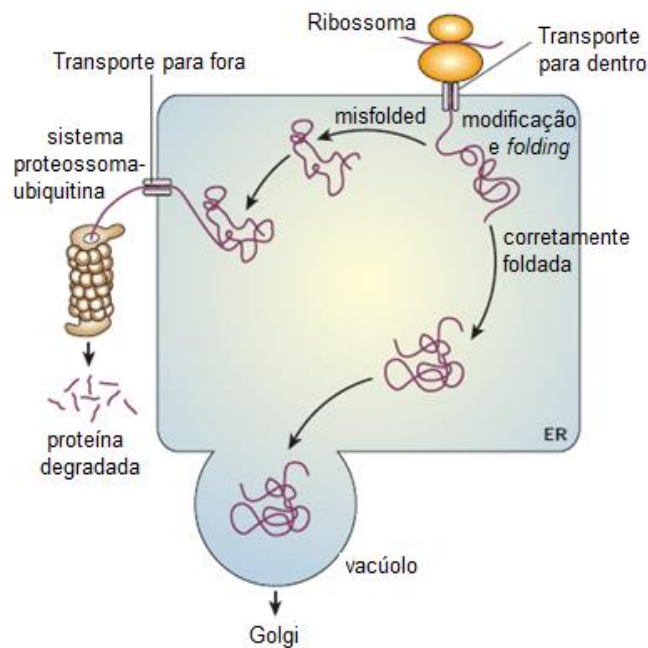


Figura 1.3: Ilustração da regulação do folding proteico no retículo endoplasmático. Adaptado de [4].

Este processo é particularmente importante porque parece haver alguns chaperões moleculares no meio extracelular. Estes mecanismos de controlo de qualidade envolvem uma série de reações de glicosilação e desglicosilação que permitem que as proteínas corretamente enroladas sejam distinguidas das proteínas *misfolded*. A resposta por proteínas de choque térmico no citoplasma está fortemente ligada à prevenção de doenças relacionadas com o *misfolding* [4, 7]. As Hsp atuam sob um controlo apertado dependente de ATP associando-se a polipéptidos desnaturados ou *misfolded*, promovendo o seu enrolamento e posterior libertação na forma nativa [13,14]. As proteínas *misfolded* são um alvo para a maquinaria de degradação [13]. Existem também chaperões moleculares que previnem a agregação, promovendo interações nativas nas espécies parcialmente enroladas prevenindo a formação de ligações não nativas que são formadas nos agregados proteicos [13].

A evolução destas maquinarias bioquímicas complexas atesta o facto de que é necessário as células isolarem e eliminarem rapidamente e eficientemente qualquer proteína desnaturada ou que esteja incorretamente enrolada logo que apareça. Em si, este fato sugere que estas espécies possam ter um efeito geralmente adverso sobre componentes celulares e viabilidade celular [3].

1.1.3 Agregação proteica e formação de amilóides

Estados parcialmente enrolados ou estados *misfolded* são problemáticos porque tendem a agregar de uma forma dependente da concentração [15]. Isto tem a ver com o facto destas

formas exporem tipicamente os resíduos hidrofóbicos e as regiões não estruturadas das cadeias polipeptídicas ao solvente [11].

As proteínas podem adotar outras conformações proteicas não-nativas, através de contactos intermoleculares resultando na formação de oligómeros, fibras, agregados ordenados ou desordenados e fibras amilóides, como ilustrado na figura 1.4.

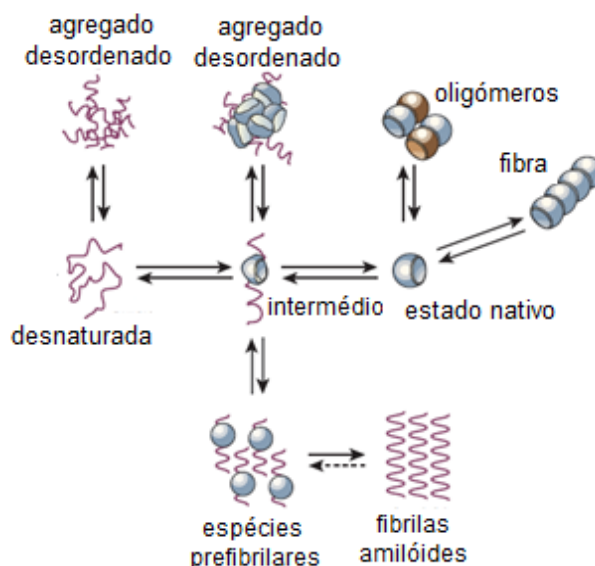


Figura 1.4: Possíveis tipos de conformações adotadas pelas proteínas a partir do estado nativo.
Adotado de [4]

O estado que é adotado por uma proteína em condições específicas depende da estabilidade termodinâmica relativa das várias conformações acessíveis e da cinética da sua interconversão. A figura 1.5 ilustra a energética proteica, mostrando a multiplicidade de estados conformacionais disponíveis para uma cadeia polipeptídica [4, 7]. De acordo com este modelo, pode observar-se que a associação intermolecular de proteínas aumenta drasticamente a sua complexidade energética (cinzento escuro) em relação ao modelo do funil de folding proteico, que descreve a alteração conformacional de uma única cadeia polipeptídica num monómero funcional (a cinzento claro) [13].

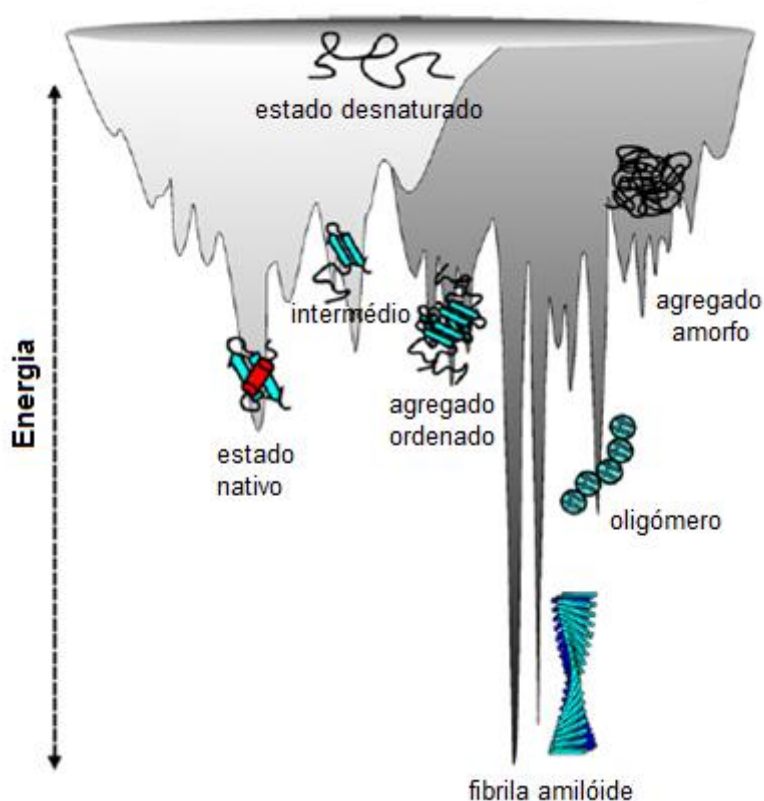


Figura 1.5: Modelo energético do folding proteico e agregação. Adaptado de [13]

A base molecular da agregação de proteínas em estruturas amilóides envolve a existência de proteínas na forma *misfolded*, ou seja, proteínas que não estão nas conformações em que normalmente funcionam *in vivo*, ou fragmentos de proteínas resultantes de processos de degradação que são inerentemente incapazes de enrolar corretamente. A agregação é uma das consequências comuns de uma cadeia polipeptídica que não consegue alcançar ou manter a sua estrutura tridimensional funcional. Tais eventos podem ser associados a mutações específicas, interações aberrantes com iões metálicos, mudanças nas condições ambientais, tais como temperatura ou pH, ou modificações químicas (oxidação, proteólise) [3,4].

Existem várias semelhanças no comportamento de agregação de diferentes peptídeos e proteínas. A primeira fase da formação parece estar envolvida na formação de oligómeros solúveis como resultado de interações relativamente não específicas, e nalguns casos, transições estruturais específicas, como troca de domínios, podem ser importantes [16]. Os agregados iniciais, agregados prefibrilares podem transformar-se em espécies com morfologias mais distintas, designadas protofibrilas. Estas estruturas são normalmente espécies fibrilares curtas, finas e por vezes enroladas, que podem evoluir em fibras maduras, por associação lateral, acompanhada por um elevado grau de reorganização estrutural (Fig. 1.6). Os agregados que se formam primeiro são estruturas relativamente desorganizadas que expõem ao exterior uma

variedade de segmentos da proteína que estão normalmente inacessíveis no estado nativo [3, 17].



Figura 1.6: Representação da formação de fibras.

Em muitos casos, as espécies que são mais tóxicas para as células são os agregados prefibrilares (por vezes referidos como agregados amorfos, micelas de proteína ou protofibrilas), e não as fibras maduras em que se desenvolvem por último, como resultado de proteção celular [11, 18]. A presença de agregados tóxicos dentro ou fora das células pode prejudicar um número elevado de funções celulares que conduzem à morte celular por um mecanismo apoptótico [3].

A natureza do estado amilóide

Em alguns casos, o estado nativo de um determinado péptido ou proteína pode não ser estruturado numa forma globular mas sim desordenada. No estado nativo de uma proteína, a maior parte das interações entre os resíduos de aminoácidos são intramoleculares, enquanto no estado amilóide predominam as interações intermoleculares. O estado nativo é termodinamicamente estável em relação ao estado amilóide se a energia livre, ΔG , do péptido ou proteína for mais baixa no estado nativo do que no estado amilóide. Como a estabilidade do estado amilóide (ΔG) é dependente da concentração de proteína, existe uma concentração na qual a estabilidade do estado amilóide é semelhante à do estado nativo; esta é designada concentração crítica. A concentrações superiores à concentração crítica, a proteína é mais estável no seu estado amilóide (Fig. 1.7) [19].

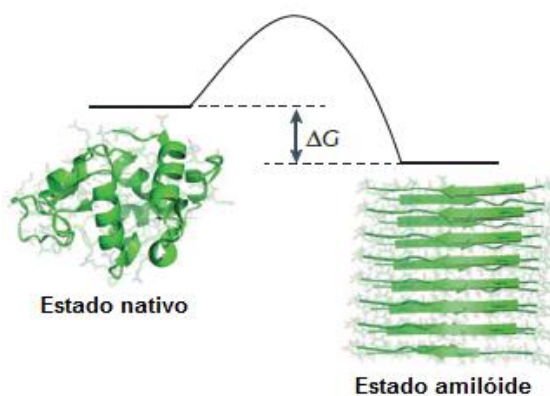


Figura 1.7: Termodinâmica do estado amilóide. Adaptado de [11]

As estruturas amilóides são empacotadas e bastante ordenadas. No entanto, diferem do estado nativo porque possuem uma arquitetura genérica rica em folhas- β , ligadas por pontes de hidrogénio perpendicularmente, formando uma estrutura *cross- β* (Fig. 1.8) [19-20].

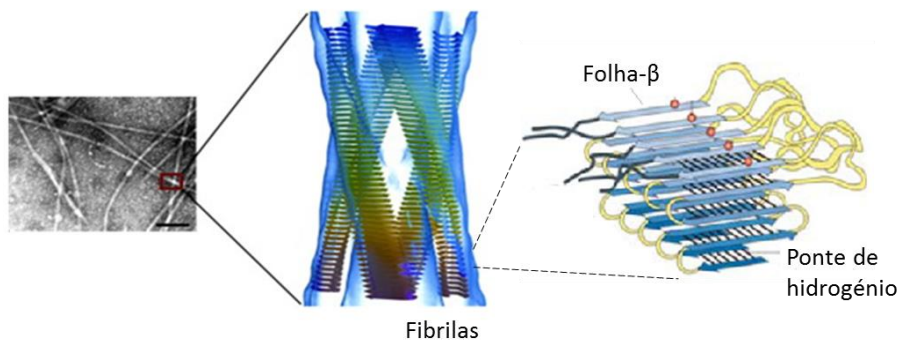


Figura 1.8: Fibrilas amilóides e esquema representativo da sua constituição

O processo de formação amilóide é descrito como uma reação de polimerização, dependente de nucleação com uma progressão sigmoidal em função do tempo. A cinética de formação amilóide pode ser dividida em três fases: a fase de nucleação (ou fase *lag*), onde há a formação de núcleos através da agregação de unidades monoméricas; a fase de elongação, onde há o crescimento dos agregados formados; e a fase de equilíbrio, como representado na figura 1.9 [21]. Este tipo de comportamento, em que a fase de nucleação é observada antes da fase de crescimento rápido, é uma característica de polimerização nucleada.

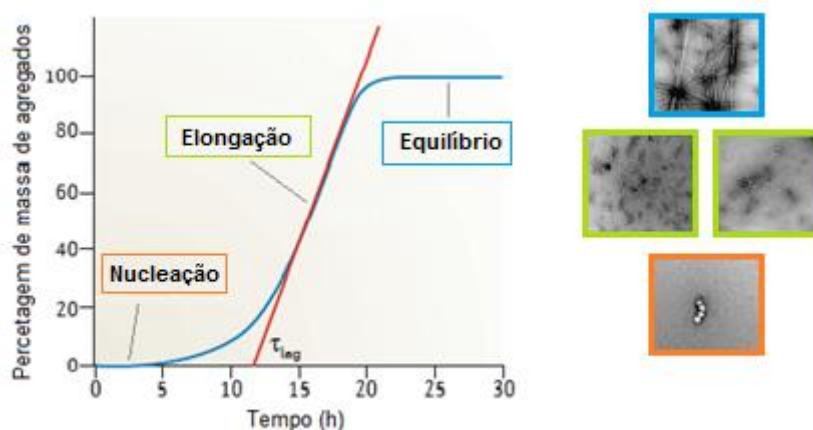


Figura 1.9: Curva sigmoidal de formação de fibras amilóides. Na figura estão demonstradas imagens de TEM dos agregados formados nas diferentes etapas da agregação. Adaptado de [19]

Uma característica fundamental da reação de polimerização dependente da nucleação é a capacidade de pequenas quantidades de fibras pré-formadas realizarem um *seeding* da reação, reduzindo significativamente a fase de nucleação.

Existem duas vias de nucleação, a nucleação primária e a secundária. Na nucleação primária, a nucleação dos agregados é homogénea e o crescimento é feito por adição de monómeros. A nucleação heterogénea e a fragmentação de filamentos são a via secundária e permitem que novos agregados sejam formados por processos que envolvem os agregados existentes, em adição à nucleação homogénea que depende apenas do nível dos monómeros solúveis (Fig. 1.10) [21].

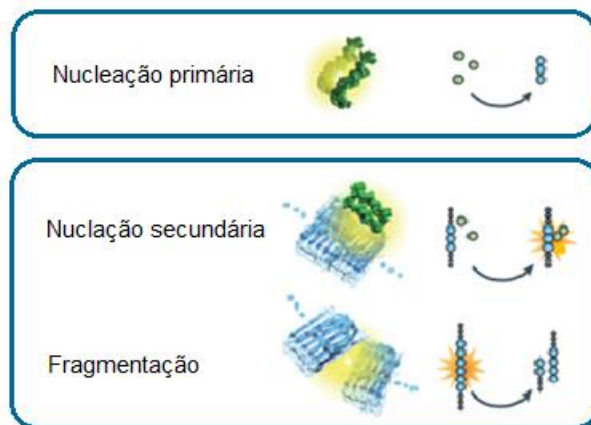


Figura 1.10: Representação das diferentes vias de nucleação no processo de agregação. Adaptado de [19]

Quando são adicionados monómeros às extremidades das fibras, elas adotam uma conformação *cross-β* para ser possível a sua ligação aos péptidos já presentes no agregado. Quando são adicionados agregados pré-formados durante a fase *lag*, pode haver a formação mais rápida de fibras, como resultado de *seeding*. O evento de fragmentação aumenta o número de extremidades de fibras que geram crescimento através da ligação de proteínas solúveis, e pode resultar numa proliferação exponencial das espécies fibrilares [19].

Mecanismos de defesa celular

A tendência inerente das proteínas para agregar faz com que seja necessário para as células desenvolverem várias defesas contra proteínas *misfolded* ou anormais. A defesa primária é realizada pelos chaperões moleculares, muitos dos quais foram identificados como proteínas de choque térmico, como referido anteriormente. Estas moléculas são capazes de *refoldar* proteínas anormais e torná-las não tóxicas (Fig. 1.11) [22].

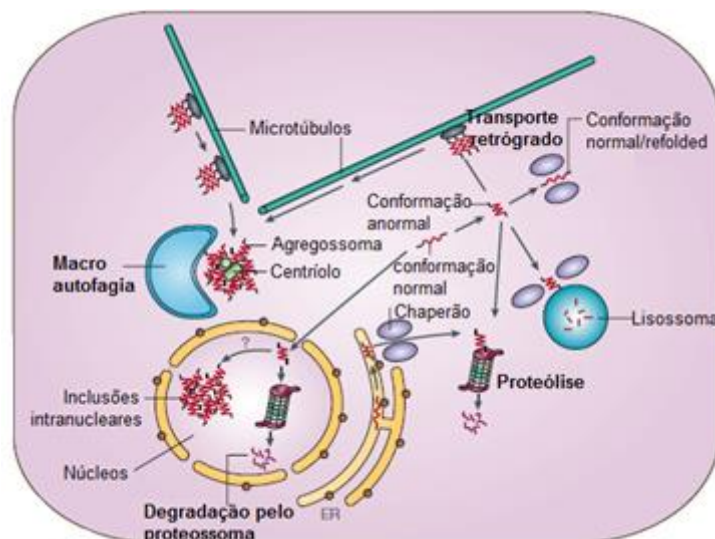


Figura 1.11: Mecanismos de defesa celular contra agregados proteicos. Adaptado de [22]

Uma segunda defesa celular importante contra proteínas *misfolded* envolve a degradação pelo proteossoma. O proteossoma é uma maquinaria molecular complexa que pode desnaturar as proteínas e processá-las em pequenos fragmentos peptídicos no espaço intracelular, que contém enzimas proteolíticas. Classicamente, as proteínas são alvo de degradação proteossomal por ubiquitinação [22]. O terceiro mecanismo de defesa envolve autofagia, que tem várias variantes, incluindo micro e macroautofagia e autofagia mediada por chaperão. As proteínas citoplasmáticas solúveis, podem ser degradadas por esta via lisossomal. A autofagia mediada por chaperão pode ser ativada por *stress* oxidativo ou *stress* de nutrientes e está envolvida na degradação de proteínas com repetições mutantes de poliglutamina (Fig. 1.11) [22].

Quando proteínas anormais ou agregadas não conseguem *refoldar* ou serem degradadas pela via de degradação proteossomal nem por autofagia, a célula tem uma linha de defesa alternativa; as células conseguem sequestrar os agregados por transporte mediado por microtúbulo e recolhê-las num local citoplasmático perto do centríolo. Este processo gera um corpo de inclusão, designado agregossoma. Estes agregossomas podem potencialmente ser eliminados por macroautofagia [22].

1.1.3 Doenças de *folding* proteico

O *misfolding* e agregação de proteínas específicas são um acontecimento notório numa variedade de doenças neurodegenerativas [20, 21]. Os agregados de proteínas citosólicas *misfolded* são encontrados em corpos celulares e processados em neurónios assimétricos. Podem existir diferentes tipos de agregados envolvidos nestas doenças, incluindo agregados desordenados ou amorfos, mas as fibras amilóides são as mais características [25, 26].

Nas doenças neurodegenerativas, é muito provável que o comprometimento da função celular provenha das interações entre proteínas agregadas e outros componentes celulares. Nas doenças não neurológicas sistêmicas, tal como a diabetes do tipo II e artrite reumatóide, no entanto, acredita-se amplamente que a acumulação de grandes quantidades de depósitos amilóides nos órgãos vitais pode, por si só, ser a causa de alguns dos sintomas clínicos [3, 23].

Está atualmente em foco um grupo de doenças de *folding* de proteínas conhecidas como amiloidoses. Neste tipo de doenças, péptidos ou proteínas específicas não atingem o estado nativo ou não permanecem corretamente *enroladas* e, agregam (muitas vezes com outros componentes) dando origem a depósitos amilóides no ambiente celular [3]. Os depósitos intracelulares presentes nas amiloidoses, (por exemplo, a proteína tau em emaranhados neurofibrilares, na AD) ou extracelulares (como o péptido A β em placas amilóides, na AD), podem ser observados em tecidos como depósitos ou placas, através de cortes histológicos (Fig. 1.12) [28].

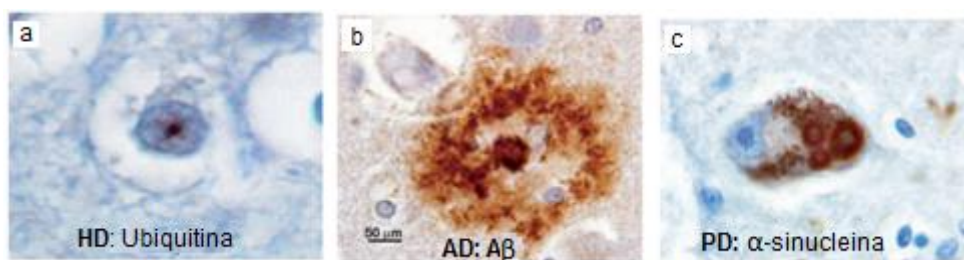


Figura 1.12: Lesões neuropatológicas de doenças neurodegenerativas. a- inclusão intranuclear marcado para a ubiquitina (cortex cerebral) num paciente com a doença de Huntington, b- placa neurítica marcada para a A β (cortex cerebral), doença de Alzheimer, c- corpos de Lewy com a α -sinucleína marcada, doença de Parkinson. Adaptado de [25].

Estas doenças incluem uma gama de doenças degenerativas, esporádica, familiar ou transmissível, algumas das quais afetam o cérebro e o sistema nervoso central (por exemplo, doenças de Alzheimer, a doença de Parkinson e doença de Creutzfeldt-Jakob), enquanto outras envolvem os tecidos periféricos e órgãos tais como o fígado, baço e coração (por exemplo, amiloidoses sistêmicas e diabetes de tipo II) [3]. Noutras formas de amiloidoses, tais como amiloidoses sistémica primária ou secundária, os depósitos proteicos são encontrados no tecido esquelético e nas articulações (por exemplo, amilóidose relacionada com hemodiálise) bem como em vários órgãos (por exemplo, coração e rim) [3, 4]. A tabela 1 resume a patologia de algumas doenças neurodegenerativas.

Tabela 1.1: Sumário de doenças neurodegenerativas: proteínas e patologia. Adaptado de [25]

Doença	Etiologia	Regiões mais afetadas	Patologia
Doença de Huntington (HD)	Huntingtin (dominante)	Corpo estriado, ganglia basal. Córtex e outras	Inclusões intranucleares e agregados citoplasmáticos
Outras doenças de poliglutaminas (DRPLA, SCA1-3...)	Atrofina-1, ataxina-1-3, etc; recetor androgénico (AR) (dominante)	Gânglios basais, cerebelo, medula espinal	Inclusões intranucleares
Doença de Alzheimer (AD)	Esporádica (fator de risco ApoE)	Córtex, hipocampo, prosencéfalo basal, tronco cerebral	Placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares
	Proteína precursora amiloide (APP) (dominante) Presenilina 1,2 (dominante)	Mesmas que a esporádica	Mesma que a esporádica
Demência fronto-temporal com Parkinsonismo	Mutações Tau (dominante)	Córtex temporal e frontal, hipocampo	Corpos
Doença de Parkinson (PD)	Esporádica	Substancia nigra, cortex, cerúleo	Corpos e neurites de Lewy
	α -sinucleína (dominante)	Semelhante à esporádica	Semelhante à esporádica
	Parkin Recessiva (algumas dominantes)	Substancia nigra	Sem corpos de Lewy
Esclerose lateral amiotrófica (ALS)	Esporádica	Neurónios motores e córtex motor	Corpos bonina e esferóides axonais
	Superóxido dismutase I (dominante)	Mesmas que a esporádica	Mesmas que a esporádica
Doenças de prião (insónia familiar fatal, CJD, GSS)	Esporádica, genética e infecciosa	Córtex, tronco cerebral, cerebelo	Degeneração espongiforme, amiloides, outros agregados

1.2 Métodos de análise estrutural e estabilidade

É necessário proceder a estudos estruturais em condições em que as proteínas normalmente atuam (em solução), assim como em outras condições, e fornecer medições de taxas de mudanças conformacionais das proteínas, que são essenciais para as suas funções biológicas.

Para analisar a estrutura das proteínas a vários níveis e monitorizar diferenças conformacionais existem vários métodos eficazes para esse fim.

1.2.1 Métodos biofísicos para monitorização do folding proteico

As proteínas em solução podem estar em duas conformações, no seu estado nativo, ou seja num estado enrolado ou no estado desnaturado, dependendo da temperatura. No seu estado nativo as proteínas têm conformações características, sendo que as partes hidrofóbicas se encontram no seu interior.

A desnaturação proteica consiste na passagem do estado nativo para uma conformação desnaturada. A estabilidade da maioria das proteínas diminui com a temperatura, e atinge o equilíbrio quando as concentrações ou a fração de proteína no estado nativo são iguais à do estado desnaturado. Neste ponto, a temperatura é considerada como temperatura de desnaturação térmica (T_m) (Fig. 1.13) [24].

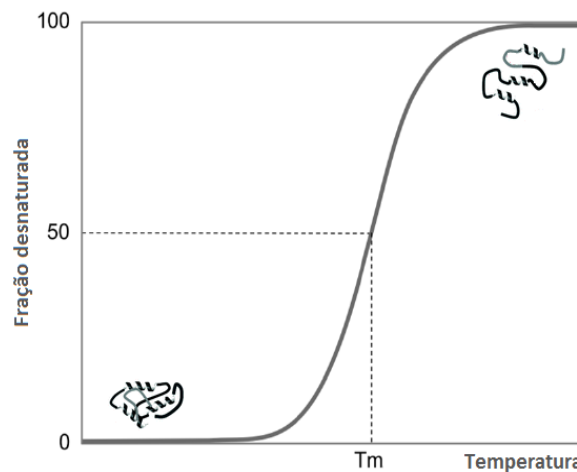


Figura 1.13: *Representação de uma curva hipotética de desnaturação em função da temperatura.*

As técnicas mais frequentemente usadas para monitorizar a desnaturação das proteínas são as de dicroísmo circular e de fluorescência.

1.2.1.1. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é um método altamente sensível para estudar o *folding*, dinâmica, associações e interações de proteínas [20-21]. Os estudos de fluorescência baseiam-se na medição da intensidade e comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência intrínseca das proteínas, ou dos fluoróforos extrínsecos quando em interação com estas.

As fluorescência intrínseca das proteínas deriva da fluorescência natural dos aminoácidos aromáticos (absorvância a 260-320nm), tais como os resíduos de triptofano (Trp) e também, mas menos, de tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe), que podem fornecer informações acerca da estrutura terciária das proteínas. A integridade da estrutura terciária pode ser observada pelo desvio para comprimentos de onda maiores, que é resultado de uma maior exposição dos aminoácidos aromáticos ao solvente [18-22].

Além da fluorescência intrínseca das proteínas, existem vários fluoróforos extrínsecos que oferecem possibilidades adicionais para a caracterização de proteínas, como estudos de estabilidade e conformação proteica e ainda estudos cinéticos de agregação. Alguns dos fluoróforos extrínsecos frequentemente utilizados são o *SYPRO Orange*, *1,8-ANS* e *ThT* [32].

A espectroscopia de fluorescência permite que os estudos sejam realizados com concentrações da ordem dos micromolar (ou inferior) e possui um rácio elevado de sinal-ruído. É um método conveniente para estudar mudanças rápidas de conformação das proteínas. É também usada para estudos cinéticos para estudos de proteínas amiloidogénicas [20, 21].

1.2.1.2. Espectroscopia de varrimento diferencial (DSF)

A espectroscopia de varrimento diferencial (*differential scanning calorimetry*, DSF) monitoriza a desnaturação térmica de proteínas através de um fluoróforo extrínseco e é tipicamente realizado num instrumento de PCR em tempo real. O DSF pode ser aplicado numa vasta gama de proteínas. Os fluoróforos que podem ser utilizados nesta técnica emitem fluorescência num ambiente não polar, como quando se liga às regiões hidrofóbicas das proteínas desnaturadas. Os vários tipos de fluoróforos que têm sido utilizados diferem consoante as suas propriedades óticas [17, 23].

O fluoróforo com propriedades mais favoráveis para este método é o *SYPRO Orange*, devido ao seu elevado rácio sinal-ruído. Há um aumento da emissão de fluorescência do *SYPRO Orange* quando este se associa às regiões hidrofóbicas da proteína [21, 31].

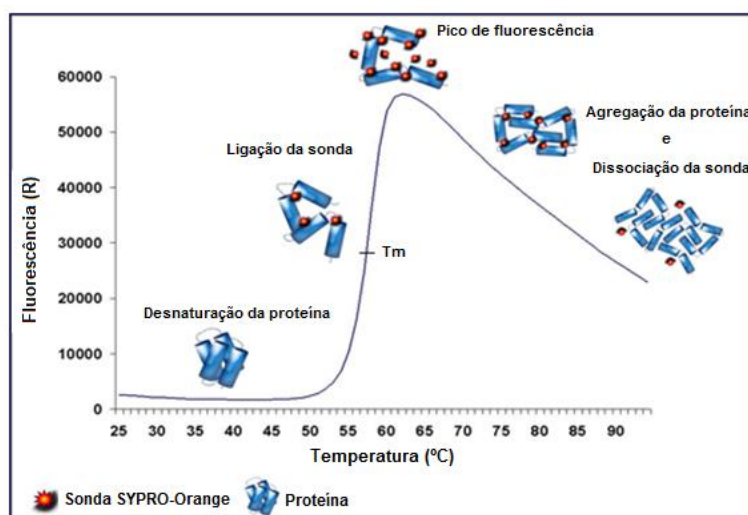


Figura 1.14: Curva típica de uma desnaturação térmica por DSF.

Os estudos cinéticos fornecem uma via particularmente viável para caracterizar a formação de novos agregados. A formação de fibras amilóides *in vitro* é normalmente monitorizada por métodos de fluorescência com fluoróforos com elevada afinidade para a estrutura amilóide, como a tioflavina-T (*ThT*), que se liga entre as folhas- β , que é o maior constituinte das fibras amilóides [18, 32].

Os ensaios podem ser desenhados para monitorizar a fração de proteína que é sequestrada em agregados, em função do tempo [21].

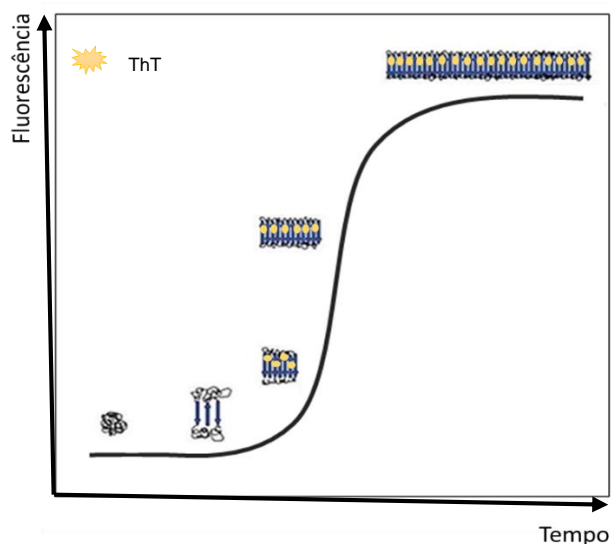


Figura 1.15: Cinética da formação de agregados em função do tempo, usando um fluoróforo.

1.3. Proteínas S100

1.3.1 Características estruturais gerais das S100

A família de proteínas S100 é constituída por 21 membros, que são apenas expressos em vertebrados [36]. Os genes codificantes da maioria das proteínas S100 humanas estão localizados na região cromossomal 1q21 [36-37]. Esta região abriga os genes do S100A1 até ao S100A16, o que é o resultado de múltiplos eventos de duplicação de genes. Os genes de outras proteínas S100, como S100B, S100P ou S100Z estão localizados nos cromossomas 21, 4 e 5, respetivamente [38]. As proteínas S100 estão funcionalmente distribuídas em 3 subgrupos: as que apresentam efeitos regulatórios intracelulares, as que têm funções intracelulares e extracelulares, e aquelas que exercem maioritariamente efeitos regulatórios extracelulares [36].

A família de proteínas S100 representa o maior subgrupo da superfamília de proteínas com domínio EF-hand que liga Ca^{2+} [35, 37, 38]. Cada domínio S100 tem cerca de 10-12kDa e contém dois motivos estruturais hélice-loop-hélice, EF-hand, ordenados de uma forma 'back-to-back' e ligados por um 'hinge' flexível (Fig. 1.16) [39].

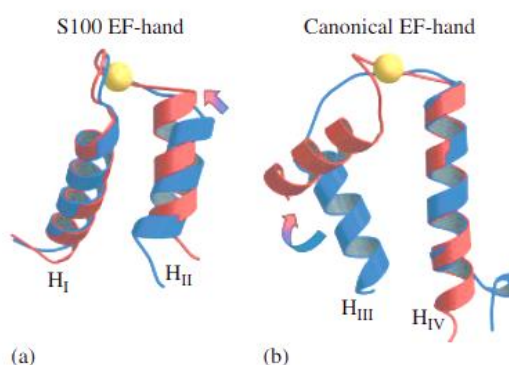


Figura 1.16: Estrutura 3D dos motivos EF-hand das proteínas S100. Adaptado de [40]

A maioria das proteínas S100 formam homo e heterodímeros, dependendo do ambiente em que estão inseridas (por exemplo iões metálicos a que estão expostas). Estas proteínas podem também formar aglomerados multiméricos, como tetrâmeros e octâmeros funcionais [37, 39].

As proteínas S100 têm a capacidade de ligar diferentes iões metálicos, e como tal a concentração destes iões pode influenciar a oligomerização destas proteínas. A tabela 2 sumariza o estado de oligomerização de algumas proteínas S100, a influência dos iões metálicos e as suas funções.

Tabela 1. 2: Influência dos íons metálicos na oligomerização das proteínas S100 e as suas funções. Adaptado de [42]

Proteína S100	Estado de oligomerização	Oligomerização dependente de metais?	Função
S100B	Dímero	Não	Liga a RAGE
	Tetâmero	Não	Liga a RAGE com alta afinidade
	Hexâmero/ octâmero	Ca ²⁺	
S100A12	Dímero	Não	Liga a RAGE
	Hexâmero	Ca ²⁺	Liga a RAGE com alta afinidade
S100A4	Multimérico	Não	Desenvolvimento neurítico
S100A8/A9	Heterodímero	Não	
	Heterotetrâmero	Ca ²⁺	Formação de microtúbulos
S100A2	Dímero	Não	Supressor de tumores
	Tetrâmero	Zn ²⁺	

1.3.2. Associação dos íons metálicos às proteínas S100

A capacidade de ligação a metais das proteínas S100 tem essencialmente uma influência como moduladores da sua conformação, *folding*, estado de oligomerização, e função. Estas proteínas são capazes de ligar diferentes íons metálicos, incluindo Ca²⁺, Zn²⁺ e Cu²⁺ [40, 45].

Cada monómero S100 é composto por 2 motivos hélice-*loop*-hélice ligantes de cálcio que formam um monómero globular contendo 4 hélices (hélice I, II, III, and IV) (Fig. 1.17) [44]. Os pares de *EF-hands* são unidos por uma cadeia- β anti-paralela muito curta e inúmeras interações hidrofóbicas entre as quatro hélices [36]. O *loop* tem uma sequência típica de 12 aminoácidos, com 6 ou 7 ligandos de oxigénio na sua cadeia principal ou na cadeia lateral, flanqueados pelas hélices HIII e HIV. O N-terminal das *EF-hand* exibe uma arquitetura ligeiramente diferente e contém um motivo específico de 14 aminoácidos flanqueados pelas hélices HI e HII.



Figura 1.17: Representação do alinhamento de um monómero de S100. Adaptado de [45].

Em geral, as proteínas S100 diméricas ligam quatro íons de cálcio por dímero com constantes de afinidade na ordem dos micromolar e centenas de micromolares. Devido às diferentes afinidades para o cálcio no C- e no N-terminal das *EF-hands* é possível a ligação dos íons cálcio, com diferentes afinidades [45].

A ligação do Ca^{2+} provoca uma alteração conformacional criada pela deslocação da hélice HIII, cerca de 90 graus, criando uma estrutura mais relaxada, expondo parte da região hidrofóbica, responsável pela interação S100-proteínas-alvo. Esta região hidrofóbica é formada por resíduos da região *hinge*, hélice HIII e C-terminais, as regiões que exibem maior variação na sequência de aminoácidos em toda a família S100. As hélices HI e HIV não são alteradas espacialmente com a ligação do Ca^{2+} , mantendo o estado dimérico das proteínas S100 [38].

Muitas proteínas S100 (S100B, S100A2, S100A3, S100A6, S100A7, S100A8/A9, S100A12) para além de cálcio também têm a capacidade de ligar Zn^{2+} em sítios específicos, com grande afinidade (Fig. 1.18). Estudos revelam que existem dois sítios putativos de ligação a zinco nas S100, que normalmente são distintos dos sítios de ligação do cálcio [42, 43].

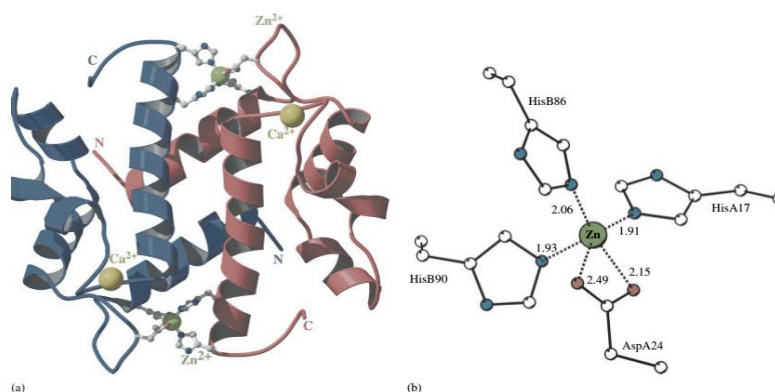


Figura 1.18: Estrutura 3D de uma proteína S100 ligada com Ca^{2+} e Zn^{2+} . Adaptado de [40].

As proteínas S100 que ligam Zn^{2+} podem ser subdivididas em dois subgrupos: um, onde os resíduos Cys estão envolvidos na coordenação do Zn^{2+} , e o segundo, onde o Zn^{2+} se liga exclusivamente via cadeia lateral aos resíduos His, Glu e Asp [38]. Algumas proteínas S100 também ligam Cu^{2+} (S100B, S100A5, S100A12 e S100A13) e esta ligação ocorre frequentemente nos mesmos sítios que o Zn^{2+} se liga [38].

Conformações do tipo amilóide

As conformações do tipo amilóide (oligómeros ricos em folhas- β , protofibrilas e fibras) podem ser acessíveis às proteínas S100 sob certas condições fisiológicas, e os íons metálicos têm um papel participativo no processo (Fig. 1.19). Encontra-se já estabelecido que os íons metálicos Ca^{2+} ,

Zn^{2+} e Cu^{2+} promovem alterações conformacionais nas S100 que têm um impacto na sua estabilidade, na formação de oligómeros funcionais e na formação de fibras amilóides.

Considerando a propensão das proteínas S100 para formar oligómeros e fibras ricas em folhas- β , prevê-se que alguns fatores podem influenciar as condições do meio celular que por sua vez podem afetar os estados funcionais destas proteínas. Alguns destes fatores são o desequilíbrio na homeostase de metais e interações proteína-metal anômalas, a inflamação, o *stress* oxidativo e / ou mutações genéticas. Estas condições podem resultar na formação de estruturas amilóides ou dos seus precursores oligoméricos no contexto fisiológico [38].

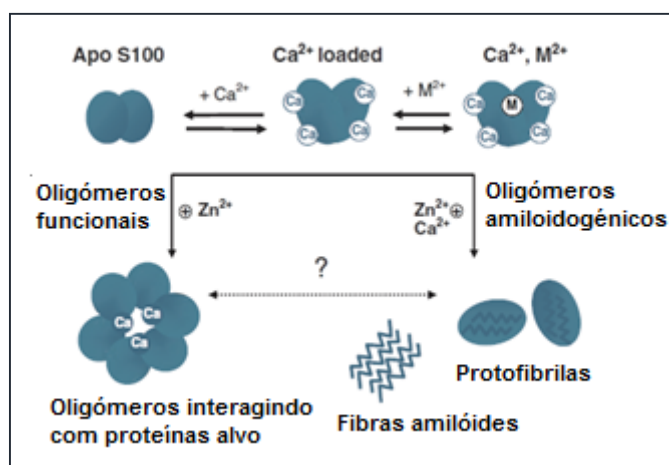


Figura 1.19: Esquema representativo da formação de agregados amilóides de proteínas S100 na presença de íons metálicos. Adaptado de [38].

1.3.3. Principais funções das proteínas S100

As proteínas S100 têm um papel central na regulação de vários processos, incluindo ciclo celular, crescimento celular, diferenciação e mobilidade. Sublinhando a importância destas proteínas na sinalização, os níveis de expressão alterados estão implicados em muitas doenças. É o caso de muitos tipos de cancro, doenças neurodegenerativas autoimunes. Portanto, as proteínas S100 exibem um interesse significativo como potenciais alvos terapêuticos [39].

No meio extracelular, as proteínas S100 atuam de uma forma autocrina e paracrina via ativação dos recetores de superfície. Como **sinalizadoras extracelulares**, as proteínas S100 regulam a proliferação, diferenciação, sobrevivência e migração celular em condições normais e patológicas, inflamação e reparação de tecidos, e podem exercer atividade anti-microbial. Certas proteínas S100 também são encontradas no soro e outros fluidos biológicos durante o decurso das condições patológicas e são usadas como marcadores de doenças [36].

No meio intracelular, as proteínas S100 atuam como sensores de Ca^{2+} , traduzindo o aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} numa resposta celular [36].

Em geral, as **funções intracelulares** das S100 podem ser agrupadas de acordo com a modelação do crescimento e diferenciação celular, regulação da homeostase de Ca^{2+} e atividades enzimáticas, nomeadamente a regulação da fosforilação mediada por cinases, e as interações com os componentes do citoesqueleto e fatores de transcrição [46].

.Crescimento celular e diferenciação: Muitas S100 regulam o crescimento celular e diferenciação, com expressão associada a vários cancros. A S100B está associada a esta função pois interage com a p53, inibindo a sua oligomerização e pode causar paragem de crescimento ou apoptose. O efeito da S100B na apoptose oferece uma ligação em relação à sobreexpressão da S100B vista em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. S100A2 e S100A11 podem inibir o crescimento de certas células. A S100A2 é predominantemente regulada no cancro da mama [46].

. Regulação da homeostase do cálcio: A regulação da homeostase do cálcio pelas S100 pode ser atribuída à sua afinidade pelo Ca^{2+} . Funções na homeostase do Ca^{2+} incluem a interação da S100A1 com o recetor da rianodina, um recetor presente no músculo-esquelético do retículo sarcoplasmico [46].

. Regulação da atividade enzimática: Apesar de não existir nenhuma proteína S100 com atividade enzimática, muitas podem regular a atividade de enzimas. Estas incluem enzimas envolvidas na regulação do metabolismo energético, no ciclo celular, maturação das células mieloides, atividade anti-inflamatória e contração muscular [46].

. Regulação da fosforilação das proteínas: Algumas S100 inibem a fosforilação através da interação com substratos de cinases, bloqueando o acesso às cinases. Outras proteínas inibidoras de fosforilação regulam etapas específicas nas vias de sinalização, nas quais as S100 têm um papel [46].

. Interação com os componentes do citoesqueleto: Existem três constituintes do citoesqueleto citoplasmático que podem ser regulados pelas proteínas S100: microtúbulos (MT), filamentos intermediários (IF) e microfilamentos (MF). A S100B pode reduzir o excesso de polimerização da tubulina e/ou remodelar os MTs seguido de elevação de Ca^{2+} citosólico, devido à sua associação com os MTs axonais, centríolos, corpos basais, fusos mitóticos, e centrossomas. Em semelhança, a S100A1 inibe a associação da tubulina [46].

1.3.4 Proteínas S100A8 e S100A9: características gerais e funções

Dentro da família das S100, as proteínas S100A8 e S100A9 tornaram-se o foco da pesquisa corrente devido à sua associação a inúmeros distúrbios, incluindo condições inflamatórias crônicas e agudas, doenças autoimunes, cancro, doenças neurodegenerativas, assim como o seu papel em processos fisiológicos normais dentro da célula [48].

As proteínas S100A8 e S100A9, também conhecidas por MRP8 e MRP14, têm massas moleculares de cerca de 11 e 14kDa e são compostas por 93 e 114 aminoácidos, respetivamente [49]. Tal como os restantes membros da família S100, possuem locais específicos de ligação a cálcio, como representado na figura 1.20 [47-48].

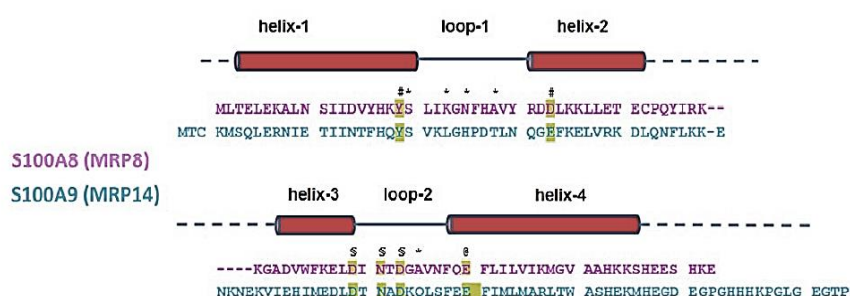


Figura 1.20: Representação do alinhamento da sequência de aminoácidos da S100A8 e S100A9. A amarelo os resíduos conservados que ligam Ca^{2+} . Adaptado de [48].

Ambas as proteínas podem formar tanto homo como heterocomplexos, formando preferencialmente heterodímeros e heterotetrâmeros numa forma dependente de Ca^{2+} e Zn^{2+} (Fig. 1.21) [49-50]. Tanto a ligação do cálcio como do zinco à proteína desencadeia alterações conformacionais e a formação de multímeros que modulam as propriedades funcionais da S100A8 e da S100A9 e as suas interações com vários alvos moleculares [51, 52, 53]. Portanto, a formação de heteromultímeros de S100A8 e S100A9 é considerado um mecanismo genérico da diversidade funcional proteica através da variação dos seus estados de conformação e pode determinar a sua associação com diferentes ligandos [55].

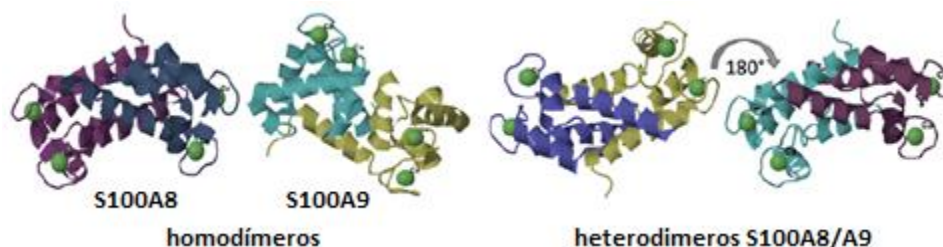


Figura 1.21: Representação terciária dos homodímeros S100A8 e S100A9 e duas projeções do heterodímero S100A8/A9. Adaptado de [48]

As proteínas S100A8 e S100A9 são expressas constitutivamente nos neutrófilos e monócitos circulantes e a sua expressão pode ser induzida nos tecidos dos macrófagos (Fig. 1.22) [54, 55]. São expressas no citosol e não são segregadas pelo caminho clássico do retículo endoplasmático/Golgi. No entanto, há uma boa evidência que a segregação a partir das células necróticas depois de danos no tecido, são a maior fonte fisiológica para a S100A8/A9 extracelular [59]. A libertação da S100A8/A9 pelos monócitos é dependente de energia e requer uma rede funcional de microtúbulos [45, 57].

As proteínas S100A8 e S100A9 apresentam funções predominantemente extracelulares, sendo a sinalização extracelular pela S100A8/A9 restrita para as diferentes etapas dos monócitos. A interação dos monócitos com o endotélio ativo inflamado é visto como um estímulo adicional específico para a libertação da S100A8 e da S100A9. Tem sido demonstrado que complexos S100A8/A9, segregados pelos fagócitos ativos, ligam especificamente a células endoteliais e ativam diretamente o endotélio microvascular, levando à perda de função da barreira, à apoptose de células endoteliais, à regulação de fatores trombogénicos e um aumento da permeabilidade juncional [45, 58].

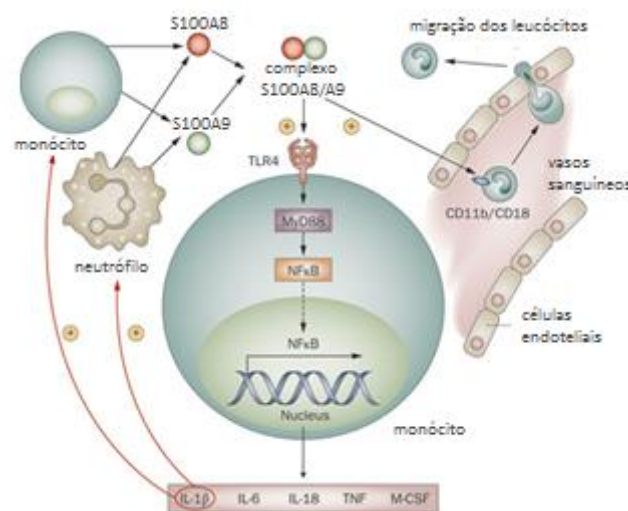


Figura 1.22: Representação de um possível ciclo de feedback positivo envolvendo as proteínas S100 de perpetuação da inflamação crônica. Vários estímulos pro-inflamatórios levam à ativação dos monócitos e neutrófilos. A ativação destas células conduz ao aumento da secreção de proteínas S100, nomeadamente a S100A8 e a S100A9. Adaptado de [62].

Quanto às funções das proteínas S100A8 e S100A9, apenas as que estão associadas às interações dependentes de cálcio do heterocomplexo com os componentes do citoesqueleto estão bem estabelecidas. As proteínas S100A8 e S100A9 ligam especificamente aos microtúbulos dos monócitos humanos e a filamentos de actina dos neutrófilos. Esta promove a polimerização da tubulina e o empacotamento de microtúbulos de uma forma dependente de Ca^{2+} (Fig. 1.23) [45, 60].

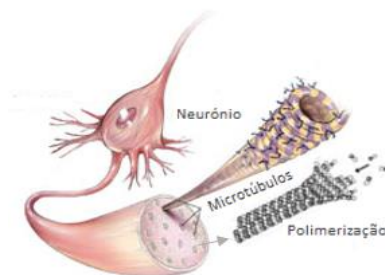


Figura 1.23: Esquema representativo dos microtúbulos e da polimerização dos mesmos.

As proteínas S100A8 e S100A9 funcionam como marcadores inflamatórios, mas também medeiam os efeitos anti e pro inflamatórios [61,62,63]. Durante a inflamação, as células produzem uma quantidade elevada de espécies reativas de oxigênio, e sendo as proteínas S100A8 e S100A9 suscetíveis a oxidação, estas podem proteger tecidos contra danos oxidativos [52, 64-65].

1.3.5 As proteínas S100A8 e S100A9 associadas à doença de Alzheimer

Como já referido, estas proteínas estão associadas a vários distúrbios e doenças neurodegenerativas. Uma das doenças em que as proteínas S100A8 e S100A9 estão envolvidas e são encontradas em elevados níveis é a doença de Alzheimer [69]. Uma vez que ainda não se conhece a causa nem a cura efetiva para este distúrbio neurológico é importante estudar os mecanismos que a envolvem de forma a progredir nos processos de tratamento.

A doença de Alzheimer na maioria dos casos tem origem familiar, causada por mutações em várias proteínas mas também existem casos esporádicos sem nenhuma componente genética sendo influenciada por fatores não-genéticos.

A doença despoleta vários sintomas como perda progressiva de memória, raciocínio espacial e atenção, dificuldade de aprendizagem, mudanças de humor e perda de independência [70], causada pela perda massiva de neurónios e disrupção da função sináptica do cérebro, começando pelo hipocampo (Fig. 1.24), que tem um papel importante na formação de novas memórias [68, 69, 70].

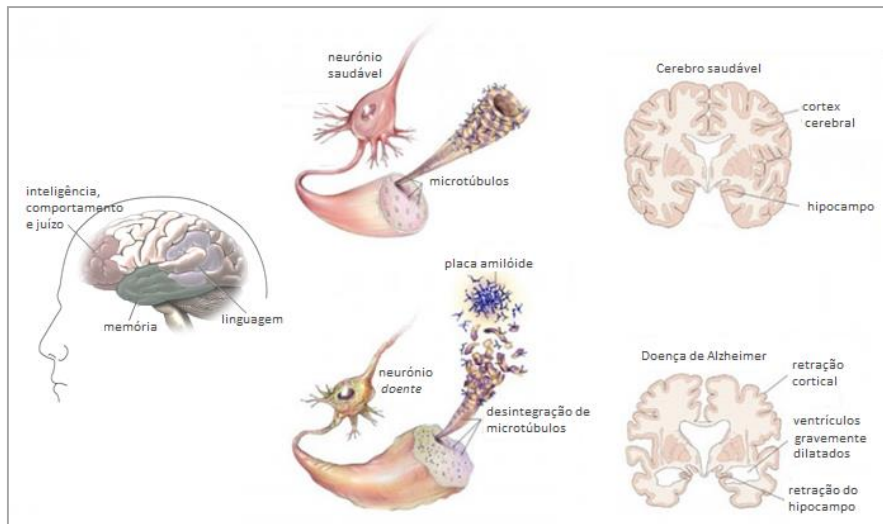


Figura 1.24: Representação das áreas do cérebro afetadas na doença de Alzheimer.

A literatura sugere que as principais mutações genéticas na doença de Alzheimer são no gene da proteína precursora beta-amilóide (APP) localizada no cromossoma 21. Todas as mutações genéticas e fatores de risco estão associadas com a produção anormal ou produção do péptido beta-amilóide ($A\beta$) (Fig. 1.25) [68, 71]. O aumento da produção dos péptidos $A\beta$ conduz à formação de agregados oligoméricos, que são normalmente tóxicos [75].

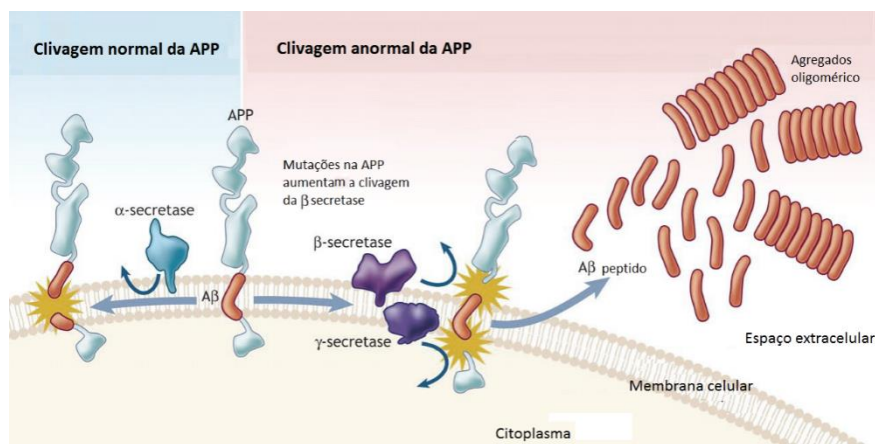


Figura 1.25: Representação dos mecanismos, normal e anormal, de clivagem da proteína precursora amilóide (APP).

Estes agregados podem depositar-se, formando placas amilóides (Fig. 1.26), que são a principal característica desta doença [76]. Outro marcador desta doença são os *emaranhados* neurofibrilares (NFT), que são constituídos principalmente pela proteína tau hiperfosforilada [72, 79].

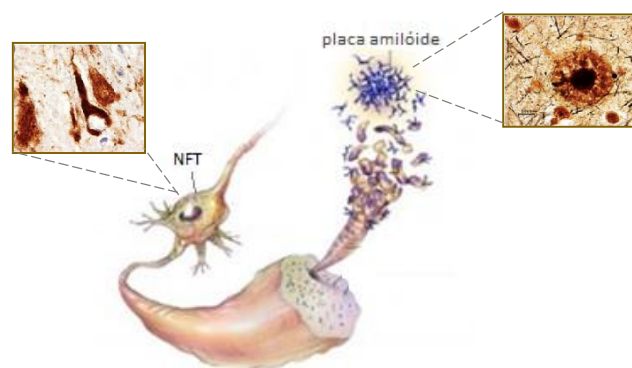


Figura 1.26: Esquema ilustrativo de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares.

Nas placas amilóides, para além dos péptidos A β , existem níveis considerados das proteínas S100A8 e S100A9. Há um aumento significativo na expressão da S100A9 pela microglia, observado no córtex temporal nos casos da AD esporádica e familiar [78].

Em modelos de ratos com AD, é observado que a produção de S100A9 é induzida pelo péptido A β e pelo fragmento c-terminal da APP (Fig. 1.27) [79] e que o *knockdown* do gene S100A9 reduz a formação de placas amilóides. Foi também demonstrado, no mesmo estudo, que a adição de dímeros e monómeros de S100A9 leva à fibrilação de A β , sugerindo interações entre a S100A9 e os agregados de A β . Estas interações parecem reduzir a citotoxicidade atribuída à S100A9 não agregada, diminuindo a neuropatologia e conduzindo a um melhoramento da aprendizagem e memória [74, 76-77].

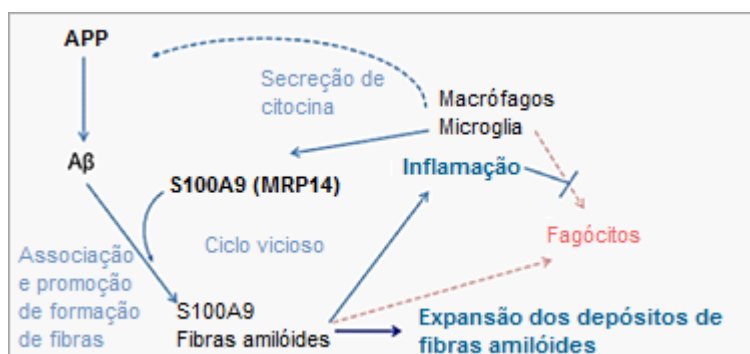


Figura 1.27: Esquema representativo do ciclo de formação de fibrilas amilóides na inflamação.
Adaptado de [80]

Os mecanismos de ação da proteína S100A8 e da S100A9 permanecem pouco compreendidos, no entanto a apreensão destes mecanismos é essencial pois estas proteínas podem ser um fator de risco e um alvo terapêutico para o diagnóstico e tratamento da AD.

Objetivo do trabalho

O principal objetivo da presente tese foi o de analisar a estabilidade térmica de duas proteínas S100, a forma dimérica da S100A9 e do heterodímero S100A8/A9, assim como a sua propensão para formar agregados. O passo inicial e crucial foi o de purificar ambas as proteínas e a otimização do processo. Os ensaios de estabilidade e de agregação foram realizados nas mesmas condições para todas as proteínas, de modo a permitir a sua comparação. Um dos aspetos importantes a estudar foi o efeito de três iões metálicos, o Ca^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , visto que estão envolvidos numa série de vias nas quais as proteínas S100 estão presentes, nomeadamente a cascata de inflamação

Um outro objetivo tinha em vista analisar a influência das mesmas proteínas S100 na agregação do péptido $\text{A}\beta_{1-42}$, a fim de decifrar os mecanismos por de trás da agregação amilóide, em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. E por fim, caraterizar a morfologia dos agregados formados.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Expressão e purificação proteica

2.1.1 Expressão e purificação dos homodímeros S100A9 e S100A8

A expressão da proteína foi realizada a partir de *stocks* de glicerol previamente preparados. A expressão e purificação foi adaptada de [83]. Realizou-se um pré-inóculo onde se incubou um *stock* de glicerol em meio DYT, suplementado com 100 mg/ml ampicilina, e 20% glucose, durante a noite a 37°C, com agitação a 150 rpm. Transferiu-se 10 ml do crescimento para 0.5 L de meio DYT, suplementado com 500µl ampicilina (100mg/ml) e 10ml 20% glucose, a 37°C, a 150 rpm, até atingirem uma $OD_{600nm} \approx 1$. Após atingirem a *DO* pretendida, as células foram induzidas com 0,5mM de IPTG e incubadas a 25°C e a 150 rpm durante a noite. Recolheram-se as células através de centrifugação (centrifuga *Beckman Coulter Avanti J25I*, com o rotor JA-10) a 8000 rpm durante 10 min., a 4°C, e congelou-se.

Para a purificação das proteínas S100A8 e S100A9, as células foram ressuspensas em 20mM Tris-HCl pH=8, com DNase (para a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster na estrutura do DNA) e 0.5mM de PMSF. As células foram partidas através de sonicação (amplitude 50%, 2s on/2s off). Para recolher os corpos de inclusão, centrifugou-se (rotor JA -25.5) a 16000 rpm durante 20 minutos e descartou-se o sobrenadante. Ressuspenderam-se os corpos de inclusão em 20 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA, 0,5% (v/v) Triton x-100 e sonicou-se novamente. Centrifugou-se (rotor JA -25.5) a 16000 rpm durante 40 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 6M guanidínio -HCl, para solubilizar as proteínas. Centrifugou-se (rotor JA -25.5) a 16000 rpm e recolheu-se o sobrenadante, contendo a proteína solúvel. Diluiu-se o extrato solúvel para 1M de guanidínio com 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA pH=8 e 0,5mM DTT para impedir a formação de pontes dissulfureto.

Seguiu-se uma cromatografia de *desalting* (*HiTrap desalting*), para remover o guanidínio e posteriormente realizou-se uma cromatografia de exclusão molecular (*Superdex 75 16/600*), usando 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM EGTA, 150 mM NaCl pH=8 e 0.5mM DTT. A partir da reta de calibração calculou-se as frações correspondentes à proteína pretendida e recolheu-se. Por fim, realizou-se uma cromatografia de troca iónica, separando as proteínas consoante a sua interação iónica com a resina da coluna, utilizou-se como tampão A: 20mM Tris-HCl 1mM EDTA 1mM EGTA pH=8, e como tampão B: 20mM Tris-HCl 1mM EDTA 1mM EGTA + 1M NaCl pH=8, 0,5mM DTT, o gradiente foi feito de 0 a 100%.

2.1.2. Expressão e purificação do heterodímero S100A8/A9

O processo de purificação do heterodímero S100A8/A9 foi adaptado de [83]. Após a expressão individual das proteínas S100A8 e S100A9, como descrito anteriormente, as células de ambas foram ressuspensas, partidas e foram recolhidos os corpos de inclusão como descrito anteriormente. Juntaram-se os corpos de inclusão da S100A8 e S100A9, havendo uma maior propensão para a formação do heterodímero do que dos homodímeros [84], e solubilizou-se em 6M guanidínio-HCl, juntaram-se os dois extratos e centrifugou-se (rotor JA -25.5) a 16000 rpm e recolheu-se o sobrenadante, contendo a proteína solúvel. Diluiu-se o extrato solúvel para 1M de guanidínio com 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA pH=8 e 0,5mM DTT para impedir a formação de pontes dissulfureto.

Seguiu-se uma cromatografia de *desalting* (coluna *HiTrap desalting*), para a remoção do guanidínio. Após remover o guanidínio, passou-se a amostra numa coluna de cromatografia de exclusão molecular (*Superdex 75 16/600*), usando o tampão 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 150 mM NaCl pH=8 e 0,5mM DTT. A partir da reta de calibração calculou-se as frações correspondentes à proteína pretendida e recolheu-se. Por fim, passou-se a fração numa coluna de cromatografia de troca iónica, separando as moléculas consoante a sua afinidade para se ligar à coluna, utilizou-se como tampão A: 20mM Tris-HCl 1mM EDTA 1mM EGTA pH=8, e como tampão B: 20mM Tris-HCl 1mM EDTA 1mM EGTA + 1M NaCl pH=8, 0,5mM DTT, o gradiente foi feito de 0 a 100%.

2.1.3. Método de obtenção da forma desmetalada (forma apo) das proteínas S100

Para retirar os iões metálicos que poderão estar ligados à S100A8 e à S100A9 as proteínas foram incubadas a 37°C, na presença de DTT (300 vezes a concentração da proteína) e 0.5mM EDTA, para quelar os metais, durante 2h. Realizou-se uma cromatografia de exclusão molecular (*Superdex 200 10/300*), com 50mM Tris-HCl pH=8 para separar os possíveis múltímeros formados durante o procedimento. A partir deste passo todas as experiências são realizadas com água chelex para evitar a ligação de iões metálicos presentes na água destilada.

2.1.4. Expressão e purificação do péptido A β ₄₂

Incubou-se o *stock* de glicerol em meio LB, suplementado com cloranfenicol, e 100 mg/ml ampicilina, a 37°C e a 150 rpm durante a noite. Posteriormente, adicionou-se 10 ml do pré-inoculo em meio M9, suplementado com 0,4% glucose, ampicilina, cloranfenicol, e tiamina, a 37°C, a 120 rpm, até atingir uma DO_{600nm}≈0,7. Após atingirem a DO pretendida, as células foram induzidas com 0,5mM de IPTG e incubadas nas mesmas condições durante 4h. Recolheram-se

as células por centrifugação (centrifuga *Beckman Coulter Avanti J25l*, com o rotor JA -10) a 8000 rpm a 4°C. Dissolveram-se as células em 100mM Tris-HCl, 10mM EDTA pH8 e congelou-se.

Para a purificação do péptido recombinante A β ₄₂, ao extrato solúvel, adicionou-se DNase e 0.5mM PMSF, até se obter uma solução homogénea. As células foram partidas através de sonicação (3 minutos, amplitude 65%, 2s on/2s off). O péptido permanece nos corpos de inclusão por isso recolheu-se o extrato insolúvel após centrifugação (rotor JA -50.5), a 140000 rpm, 4°C. Ressuspenderam-se os corpos de inclusão em 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8 e sonicou-se novamente. Após a última centrifugação, dissolveu-se os corpos de inclusão em 8mM ureia, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8, até se obter uma solução líquida e homogénea. Diluiu-se para 2M de ureia em 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH=8 e realizou-se uma cromatografia de troca iónica, adicionando-se 6g de resina-DEAE à solução. Filtrou-se a solução, e eluiu-se várias vezes com 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH=8 e posteriormente com 25mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH8 1mM EDTA, para remover proteínas contaminantes. O péptido A β ₄₂ foi eluído com 125mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH8 1mM EDTA.

De seguida para excluir as proteínas maiores que 30 kDa, utilizou-se um passo de concentração utilizando um centricon 30kDa e por fim, concentrou-se utilizando um *centricon* de 3 kDa e liofilizou-se a amostra.

Antes do início dos ensaios com o péptido A β ₄₂, é necessário passar a proteína por uma coluna de exclusão molecular de modo a obter o monómero. Para tal, ressuspendeu-se a proteína liofilizada em 7M guanidínio pH=8 e incubou-se pelo menos 1h a 4°C, seguindo-se a cromatografia, com uma coluna *Superdex 75 10/300*.

2.2. Método de análise da estrutura secundária e estabilidade

O método utilizado para analisar a estrutura secundária das proteínas foi o dicroísmo circular. Traçaram-se espectros na região uv-distante entre 200 a 260 nm.

Para a monitorização da estabilidade térmica das proteínas traçaram-se espectros na região uv-distante entre 200 a 260 nm, usando uma gama de temperatura entre 25 e 95°C, com monitorização do sinal a 222nm.

As amostras utilizadas tinham uma concentração de 0,3mg/mL, em 50mM Tris-HCl pH=7.4. Foi utilizada uma cuvete de luz polarizada com um percurso óptico de 1mm.

2.3. Método de análise de estabilidade

Para analisar a estabilidade das proteínas e determinar a temperatura de desnaturação Não

utilizou-se varrimento diferencial de fluorescência (DSF). O fluoróforo utilizado foi o *Sypro Orange* (Invitrogen).

As amostras foram preparadas em 50mM Tris-HCl pH 7,4, na presença de 5mM TCEP, numa concentração de 5µM de proteína e 5x *Sypro Orange*. Foi também analisada a estabilidade na presença de íões metálicos, Ca^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , em concentrações que variam entre 10 a 50 µM.

As amostras foram colocadas em placas de 96 poços. Utilizou-se o instrumento TermoFluor, e foi medida a intensidade de fluorescência, usando um filtro de excitação de 530 a 560 nm e um filtro de emissão de 575 a 595 nm, numa gama de temperatura dos 20 aos 98°C.

2.4. Ensaios de cinéticas de agregação

Foi utilizada espectroscopia de fluorescência para monitorizar a cinética de agregação das proteínas, através da ligação do fluoróforo Tioflavina-T (*Milipore*).

As amostras foram preparadas em 50mM Tris-HCl pH7.4, na presença de 5mM TCEP e 2x ThT. As concentrações de proteína utilizadas foram de 20 a 100 µM, sendo utilizada maioritariamente a de 40 µM. Foram também feitos ensaios na presença de íões metálicos, Ca^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , em concentrações que variam entre 20 a 160 µM.

As placas de 96 poços (*Corning*), foram analisadas no instrumento *FluoStar Optima* (BMG Labtech), com um filtro de excitação de 440nm e um filtro de emissão de 480nm e um ganho de 1800. As cinéticas foram realizadas a uma temperatura de 37°C, com ciclos de agitação a 86 rpm 20 segundos antes da aquisição.

III- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Purificação das proteínas S100A8 e S100A9

A expressão da proteína hS100A9 foi realizada a partir de *stocks* de glicerol previamente preparados. Na primeira etapa de purificação foram feitos passos sucessivos de sonicação e centrifugação e solubilização com guanidínio, para lisar as células e isolar os corpos de inclusão onde a proteína S100A9 se encontra maioritariamente, como se observa na figura 3.31, poços 2, 4 e 6.

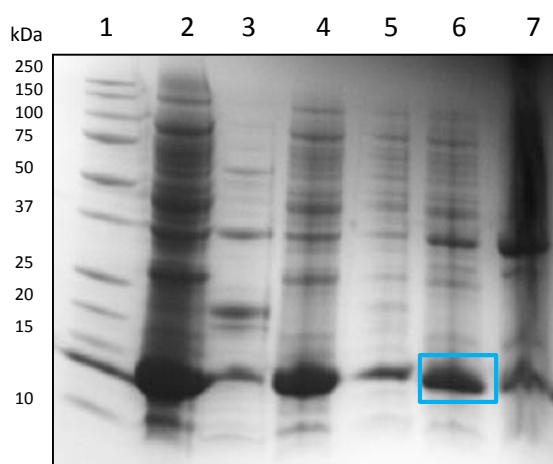


Figura 3.1: Purificação do homodímero S100A9. Gel SDS-PAGE: 1- marcador all blue, 2- extrato insolúvel após 1ª centrifugação, 3- sobrenadante após 1ª centrifugação, 4- extrato insolúvel após a 2ª centrifugação, 5- sobrenadante após a 2ª centrifugação, 6- sobrenadante após a solubilização com guanidínio, 7- extrato insolúvel após a solubilização com guanidínio

Na figura 3.1, observando os poços 2 e 3 pode ver-se que a proteína em estudo está maioritariamente na fração insolúvel (poço 2). Após a exclusão de outras proteínas solúveis, prosseguiu-se a uma segunda etapa de sonicação e centrifugação (Fig. 3.1 – 4 e 5) observando-se uma amostra mais pura do que a anterior (poço 4 em relação ao poço 2). Por fim, solubilizaram-se os corpos de inclusão em guanidínio. Realizou-se uma última centrifugação para recolher o extrato solúvel, contendo a proteína S100A9 (Fig. 3.1 – 6).

Para a obtenção de uma maior pureza foi necessário proceder a várias técnicas cromatográficas. Para remover o guanidínio realizou-se uma cromatografia de *desalting*. Este passo é bastante importante, pois a exposição prolongada da proteína ao guanidínio pode deixar a proteína *misfolded* permanentemente.

Seguidamente, realizou-se uma cromatografia de exclusão molecular. Nesta etapa foi possível separar as proteínas da amostra em função do seu tamanho. Pelo cromatograma (Fig. 3.2 – A), pode observar-se a presença de várias bandas correspondentes a proteínas com diferentes pesos moleculares. Pela reta de calibração foi possível seleccionar o pico correspondente à

eluição do homodímero de S100A9, pelo peso molecular da mesma. A confirmação da presença da proteína no pico escolhido foi realizada por eletroforese SDS-PAGE (fig. 3.2 – C: 4).

Por último, realizou-se uma cromatografia de troca iônica, que possibilita a separação de proteínas através do aumento da força iônica. O gradiente foi entre 0 e 1M NaCl, até se eluir todas as proteínas (Fig. 3.2 – B). O pico de eluição correspondente ao homodímero S100A9 foi confirmado, mais uma vez, por eletroforese SDS-PAGE (Fig. 3.2 – C:5). Após estes passos cromatográficos obteve-se proteína S100A9 com elevado grau de pureza, como observado na figura 3.2 – C:5. A purificação do homodímero S100A8 foi feita de forma semelhante, sendo que os resultados se encontram em anexo.

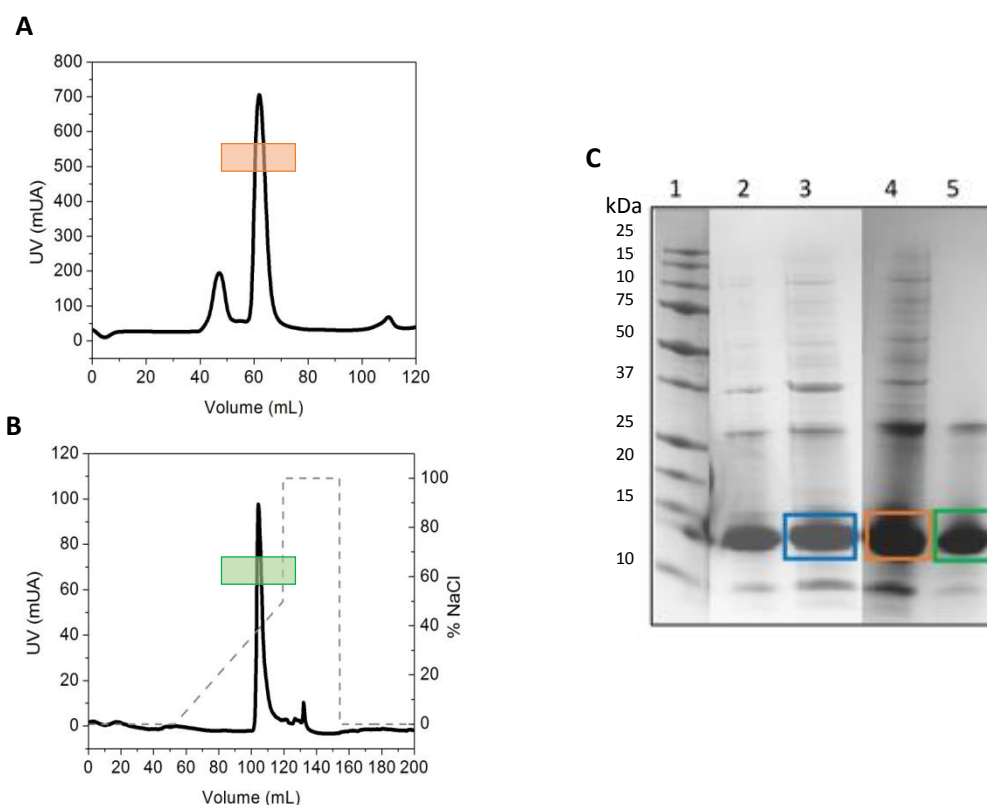


Figura 3.2: Purificação do homodímero S100A9. A- Cromatografia de exclusão molecular. B- Cromatografia de troca iônica. C- Gel SDS-PAGE das diferentes etapas de purificação: 1-marcador all blue, 2- extrato solúvel da S100A9, 3- pico cromatografia de desalting, 4- pico cromatografia de exclusão molecular, 5- pico cromatografia troca iônica.

Foram concebidas algumas otimizações ao protocolo inicial da expressão e purificação das proteínas S100A8 e S100A9, a fim de se obter um maior rendimento.

Prosseguiu-se a uma alteração aquando da expressão das proteínas S100A8 e S100A9, após a indução das células com IPTG, onde inicialmente se realizava uma incubação com este indutor de cerca de quatro horas. Este passo foi substituído, deixando-se incubar durante a noite, cerca de dezasseis horas, tendo-se obtido um maior rendimento de células.

Em relação à purificação, na etapa de remoção do guanidínio, inicialmente foi realizada por diálise, no entanto ocorria a formação de precipitados proteicos, o que prejudica o rendimento da purificação, pois pode levar à perda da proteína de interesse. Este passo foi substituído por uma cromatografia de *desalting*, permitindo uma troca mais rápida e eliminando a formação de precipitados.

A otimização da expressão e purificação levou a um rendimento de cerca de 21 vezes superior ao inicial (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Rendimentos obtidos na purificação do homodímero S100A9 antes e após a otimização.

Rendimento inicial (mg S100A9/L de cultura celular)	Rendimento após otimização (mg/L)
3,5	74

3.1.2. Purificação do heterodímero S100A8/A9

Para formar o heterodímero S100A8/A9 foi necessário expressar as proteínas S100A8 e S100A9 individualmente, como descrito anteriormente. A primeira etapa da purificação do heterodímero S100A8/A9 é realizado com as proteínas separadamente até à obtenção dos corpos de inclusão de ambas as proteínas (Fig. 3.3 – A: 2,3)

Os corpos de inclusão de ambas foram reunidos, solubilizando-os com guanidínio. Quando se junta os corpos de inclusão de ambas, espera-se a formação do heterodímero, pois no ambiente celular, as proteínas S100A8 e S100A9 formam predominante o heterocomplexo [84]. O extrato solúvel contendo as proteínas foi recolhido por centrifugação (Fig. 3.3 – A: 4).

Os passos cromatográficos foram semelhantes aos realizados para a proteína S100A8 e S100A9 individualmente (Fig. 3.3 – B,C). Observa-se a separação de proteínas, levando à isolamento do heterodímero S100A8/A9 (Fig. 3.3 – D).

Após a cromatografia de permuta iónica, isolou-se o heterodímero S100A8/A9 com elevado grau de pureza, não se observando nenhuma banda adicional à das proteínas S100A8 e S100A9, pelo gel (Fig. 3.3 – D:5).

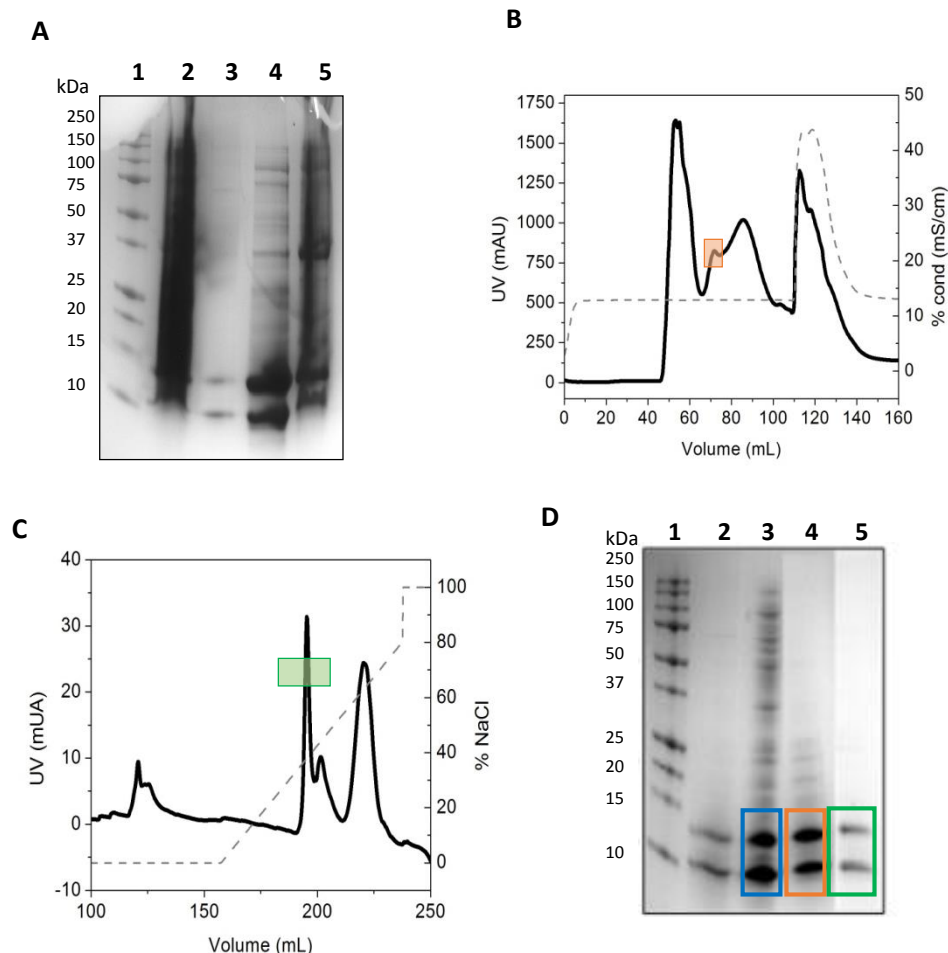


Figura 3.3: Purificação do heterodímero S100A8/A9. A- gel SDS-PAGE dos vários passos de centrifugação da S100A8/A9: 1- all blue, 2- extrato insolúvel após solubilização de ambos os corpos de inclusão em tampão 20mM Tris-HCl+ 10mM EDTA+ Triton x-100, 3- sobrenadante após solubilização de ambos os corpos de inclusão em tampão 20mM Tris-HCl+ 10mM EDTA+ Triton x-100, 4- sobrenadante após solubilização com guanidínio, 5- extrato insolúvel após solubilização com guanidínio, B- Cromatografia de exclusão molecular. C- Cromatografia troca iônica. D- Gel SDS-PAGE: 1-marcador all blue, 2- pico cromatografia de desalting, 3- pico cromatografia de exclusão molecular, 4- pico cromatografia troca iônica.

Obteve-se um rendimento de 16 mg do heterodímero S100A8/A9 por litro de cultura, que era o esperado segundo o protocolo [83]. O rendimento da purificação do heterodímero é muito menor que a do homodímero, o que pode dever-se às diferentes formas que estas proteínas podem interagir entre si, podendo não ter havido apenas a formação do heterodímero.

3.2 Purificação do péptido A β ₁₋₄₂

A expressão do péptido A β ₁₋₄₂ foi realizada a partir de *stocks* de glicerol previamente preparados. Os primeiros passos da purificação deste péptido foram sucessivas sonicações e centrifugações para isolar os corpos de inclusão, onde se encontra o péptido A β . Os corpos de inclusão foram solubilizados em ureia. Pela figura 3.4 (poços 2 e 3) pode confirmar-se a separação de proteínas, ficando estas no extrato solúvel.

A etapa seguinte foi a realização de uma cromatografia de troca iónica em *batch*, usando resina-DEAE. Em estudos realizados anteriormente constatou-se que o uso de cromatografia em *batch* conduzia a um rendimento muito superior em relação à cromatografia de troca iónica em coluna [76]. A resina foi colocada em contato com o extrato solúvel da proteína, em agitação, para garantir que toda a proteína se ligasse à resina. Foram realizadas várias eluições com diferentes tampões, aumentando a força iónica a cada lavagem, com a adição de NaCl. Nos poços 4, 5 e 8 estão as amostras relativas à primeira, segunda e terceira eluição com os diferentes tampões com um aumento da força iónica. Pela figura 3.4 pode observar-se a presença do péptido nos poços 7 e 8, com uma banda a cerca de 4kDa, sugerindo que a proteína é eluída com maior concentração de sal, durante a terceira eluição.

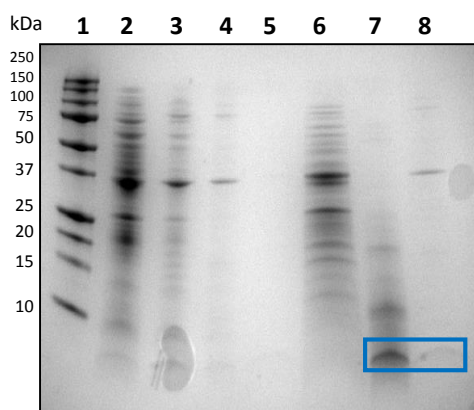


Figura 3.4: Purificação do péptido A β ₁₋₄₂. 1- marcador all blue, 2- sobrenadante após 1ª centrifugação, 3- sobrenadante após 2ª centrifugação, 4- eluição com o tampão 10mM Tris-HCl + 1mM EDTA pH=8, 5- eluição com o tampão 25mM NaCl+ 20mM Tris-HCl + 1mM EDTA pH=8, 6 – concentrado do centricon de 30 kDa, 7- extrato da proteína após concentração, 8- eluição com o tampão 125mM NaCl+ 20mM Tris-HCl+ 1mM EDTA pH=8.

Para separar as proteínas maiores, superiores a 30 kDa, das menores, que é o caso do péptido A β , usou-se um filtro com um *cut-off* de 30kDa (*centrincon*). Na figura 3.4 no poço 6 observa-se o concentrado, confirmando a separação de proteínas maiores, que não a de interesse.

Neste processo conseguiu-se um rendimento de cerca de 16 mg por litro de cultura. Este rendimento está entre os valores esperados segundo os autores do protocolo [76].

3.3 Efeito dos íons metálicos na estrutura e estabilidade das proteínas S100A9 e S100A8/A9

Um dos aspectos importantes no estudo de proteínas é estudar a sua estabilidade térmica e que fatores podem influenciar essa estabilidade. Para o nosso estudo em particular pretende-se averiguar o efeito dos metais na estabilidade térmica das proteínas em estudo, S100A9 e S100A8/A9, visto que estas têm capacidade de ligar diferentes íons metálicos, com o intuito de averiguar se a ligação de metais à proteína provoca alterações conformacionais que levem à exposição das regiões hidrofóbicas. Uma das técnicas que pode dar essa informação é o DSF, que foi a técnica escolhida, utilizando o fluoróforo *SYPRO Orange*

3.3.1 Efeito dos íons metálicos na estrutura e estabilidade da S100A9

O homodímero S100A9 liga diferentes íons metálicos, como Ca^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , sendo que num dímero de S100A9 existem quatro ligações a cálcio e pensa-se que os sítios de ligação a cobre e zinco encontram-se entre os monómeros [48]. A ligação dos íons às proteínas podem destabilizar a estrutura nativa destas, modificando a sua conformação, pelo que a presença de metais pode influenciar o comportamento aparente das transições de desnaturação [85].

As proteínas S100 têm a capacidade de ligar cálcio e este é um metal essencial para a execução das suas funções [36]. Os quatro sítios de ligação a cálcio da S100A9 têm diferentes afinidades para o mesmo [48]. É, portanto, importante estudar de que forma o cálcio pode afetar a estabilidade térmica desta proteína, com intuito de perceber o que acontece quando este metal está presente no meio celular e de que forma a ligação do metal pode influenciar a conformação da proteína.

A temperatura de desnaturação determinada, por estimativa, para a apoproteína S100A9 foi de 58 °C, o que corrobora com a literatura, onde a temperatura de desnaturação é cerca de 53 °C [83]. A presença de cálcio diminui a estabilidade térmica da S100A9, relativamente à sua forma desmetalada, sugerindo que a ligação deste íon metálico provoca alterações conformacionais na proteína. As diferentes concentrações de cálcio (2x, 4x, 10x a concentração de proteína), não alteraram entre si a estabilidade térmica da S100A9 de forma significativa (Fig. 3.8 – A). Estes resultados sugerem que os íons cálcio provocam alterações conformacionais no homodímero S100A9, que promovem a exposição das regiões hidrofóbicas, acelerando o processo de desnaturação. Portanto o cálcio pode ser considerado destabilizador da S100A9. Outro aspeto a ser considerado nestes ensaios é o declive das curvas apresentadas. Pode verificar-se uma diferença entre o declive da S100A9 na forma desmetalada e do homodímero na presença dos íons metálicos, tendo esta última um declive mais acentuado. Estes resultados podem sugerir

que no processo de desnaturação, a S100A9 forme uma gama maior de conformações intermédias diferentes, e quando se encontra ligada a cálcio há um estreitamento de conformações, consequência de uma destabilização cooperativa [86] [87]. A desnaturação cooperativa é caracterizada por uma curva sigmoidal abrupta, onde o processo de desnaturação é designado de dois estados, sendo o inicial a estrutura nativa e o final a estrutura desnaturada, enquanto as populações conformacionais parcialmente enroladas/desnaturadas são pequenas [87].

Para além de cálcio, a S100A9 tem a capacidade de ligar cobre, mas em sítios de ligação distintos [38]. A existência de iões cobre em solução também diminui a estabilidade térmica do homodímero S100A9. As diferentes concentrações de cobre, não alteraram entre si a estabilidade térmica do homodímero S100A9 (Fig. 3.5 – B), portanto pode aferir-se que o efeito do cobre na estabilidade da S100A9 não é dependente da concentração. Contudo, segundo a figura 3.6, pode observar-se uma diferença de cerca de 16 °C na temperatura de desnaturação, que já é considerada significativa, entre a proteína desmetalada e a proteína ligada a cobre. Estes resultados sugerem que os iões de cobre provocam alterações conformacionais no homodímero S100A9, que aceleram o processo de desnaturação. Portanto, tal como o cálcio, o cobre pode ser considerado destabilizador da S100A9.

Por fim, fizeram-se os mesmos ensaios na presença de zinco, uma vez que a S100A9 também tem locais de ligação a zinco, distintos dos de cálcio, onde o zinco se liga com grande afinidade, mas que ainda não se encontram identificados [38]. Tal como os outros iões metálicos, o zinco diminui a estabilidade da proteína em relação à sua forma desmetalada. As diferentes concentrações de zinco, não alteraram entre si a estabilidade térmica do homodímero S100A9, como visto na figura 3.8 – C, no entanto nota-se uma pequena diferença entre a menor concentração de zinco e as maiores. Pode verificar-se uma diferença de cerca de 10°C (Fig. 3.6) na temperatura de desnaturação entre a apoproteína e a proteína ligada a zinco (0,5%). Estes resultados sugerem que os iões de zinco provocam alterações conformacionais no homodímero S100A9, que aceleram o processo de desnaturação e parece que quanto menor a concentração de zinco maior a alteração conformacional. Portanto o zinco pode ser considerado destabilizador da S100A9.

Analisando o efeito dos três iões metálicos na estabilidade do homodímero, pode aferir-se que todos eles destabilizam de certo modo a S100A9, acelerando a exposição das regiões hidrofóbicas da S100A9. Estes resultados podem sugerir que na presença destes iões metálicos a S100A9 possa ter comportamentos fisiológicos diferentes, devido à sua destabilização, que são influenciados por estes metais.

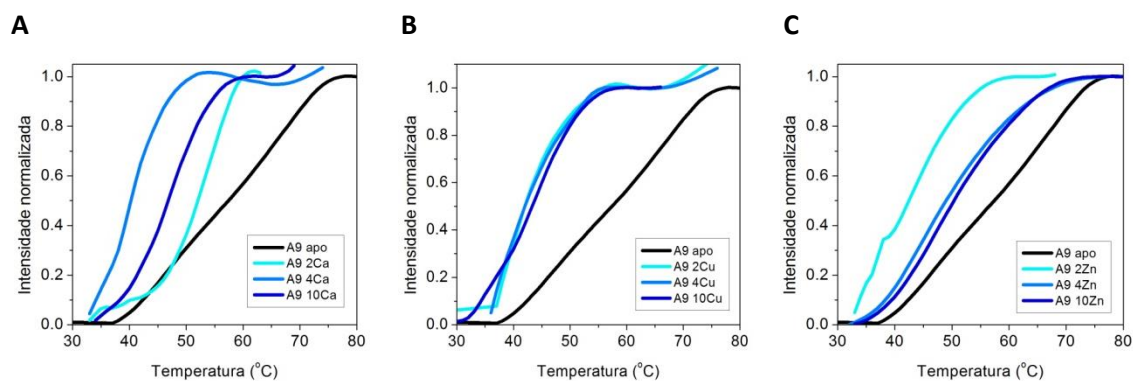


Figura 3.5: Monitorização da desnaturação térmica do homodímero S100A9 na presença de várias concentrações de íões metálicos, por DSF. A- Desnaturação térmica na presença de cálcio. B- Desnaturação térmica na presença de cobre. C- Desnaturação térmica na presença de zinco.

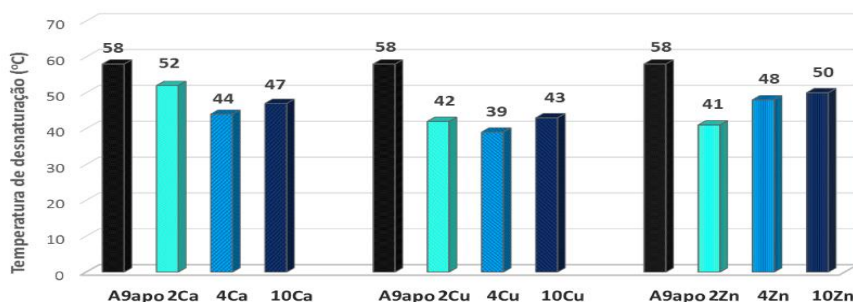


Figura 3.6: Temperaturas de desnaturação do homodímero S100A9 na presença de várias concentrações dos íões metálicos.

Como se verificou que a ligação de um íon metálico provoca alterações conformacionais na proteína, o passo seguinte destinou-se à observação da influência de dois íões metálicos em simultâneo na estabilidade térmica da S100A9 a fim de perceber de que forma a ligação simultânea de dois íões pode alterar a conformação e se esta ligação tem ou não efeito na estabilidade, uma vez que a S100A9 apresenta locais de ligação diferentes aos três metais, e no seu meio esta proteína pode estar em contato com diferentes metais. Obteve-se pelo uso de uma concentração de metais de quatro vezes superior à concentração de proteína, de modo a garantir que todos os locais de ligação a estes metais estivessem preenchidos.

Anteriormente constatou-se que os íões metálicos cálcio, cobre e zinco separadamente destabilizam termicamente a proteína, contudo, a presença de dois íões metálicos em simultâneo nas mesmas proporções têm efeitos diferentes (Fig. 3.7).

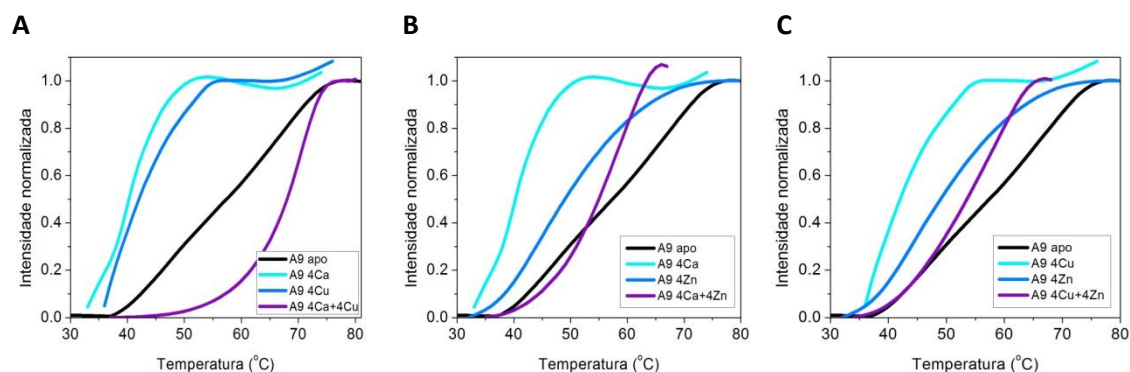


Figura 3.7: Monitorização da desnaturação térmica do homodímero S100A9 na presença de dois íões metálicos em simultâneo, por DSF. A- Desnaturação térmica do homodímero na presença de cálcio e cobre (160 μ M). B- Desnaturação térmica do homodímero na presença de cobre e zinco (160 μ M). C- Desnaturação térmica do homodímero na presença de cálcio e zinco (160 μ M).

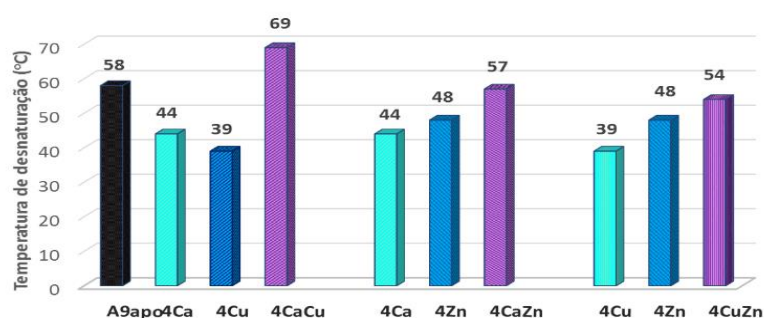


Figura 3.8: Temperaturas de desnaturação do homodímero S100A9 na presença de dois íões metálicos em simultâneo.

O homodímero S100A9 na presença de cálcio e cobre em simultâneo apresenta uma temperatura de desnaturação estimada de 69°C, na presença de cálcio e zinco de 57 °C e na presença de cobre e zinco de 54 °C (Fig. 3.8). Comparando estes valores com a temperatura de desnaturação da proteína desmetalada (58 °C), verifica-se que apenas na presença de cálcio e cobre em simultâneo, a proteína torna-se termodinamicamente mais estável. Este resultado sugere que quando a proteína tem os locais de ligação de cálcio e cobre preenchidos esta apresenta uma conformação mais estável, com as regiões hidrofóbicas mais protegidas. A curva de desnaturação na presença destes dois íões também é diferente, assemelhando-se a uma curva cooperativa de dois estados.

Em relação à ligação de cálcio e zinco à S100A9 (Fig. 3.7 – B) e de cobre e zinco (Fig. 3.7 – C) verifica-se que apesar de a temperatura de desnaturação não alterar relativamente à S100A9, pode observar-se que as curvas monitorizadas são diferentes, revelando mais uma vez a sua influência na diminuição de conformações intermédias, visto que a curva se assemelha mais a uma curva sigmoideal característica de uma desnaturação de dois estados [85].

Mudanças na concentração de cálcio citosólico regula uma variedade de processos celulares e proteínas que ligam cálcio, como a S100A9, constituem moléculas chave para a sinalização da transdução, diferenciação e controlo do ciclo celular [64]. A S100A9 interage com proteínas alvo

de uma forma dependente de cálcio. Portanto as alterações na estabilidade, dependente da concentração de cálcio, podem estar relacionadas com as suas atividades celulares.

A exposição de resíduos hidrofóbicos do homodímero S100A9 ao solvente pode ser responsável pela ligação de moléculas alvo [64]. Portanto a ligação dos metais pode estar associada à interação da S100A9 com outras moléculas. Sendo que os metais aceleram a exposição de regiões hidrofóbicas da S100A9, podem facilitar a interação com outras moléculas, alterando a conformação do homodímero.

3.3.2 Efeito dos íons metálicos na estrutura e estabilidade da S100A8/A9

Foram realizados os mesmos ensaios para o heterodímero S100A8/A9, nas mesmas condições, visto esta proteína também tem locais de ligação para os mesmos íons metálicos, com o intuito de perceber se as ligações dos metais têm o mesmo efeito que o homodímero ou se há diferentes mudanças conformacionais sendo as subunidades do dímero diferentes. Na figura 3.9 estão representadas as desnaturações térmicas da S100A8/A9 na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} .

A temperatura de desnaturação obtida para o heterodímero foi de 69 °C, que está de acordo com a encontrada na literatura, 68 °C [83]. A presença dos íons metálicos cálcio, cobre e zinco não afetam significativamente a estabilidade térmica do heterodímero, ao contrário do que se sucede com o homodímero S100A9. Em termos do comportamento da curva de desnaturação também não se observa diferenças entre o heterodímero e a S100A8/A9 ligada com metais. Ambas apresentam um comportamento que sugere uma desnaturação característica de dois estados [85].

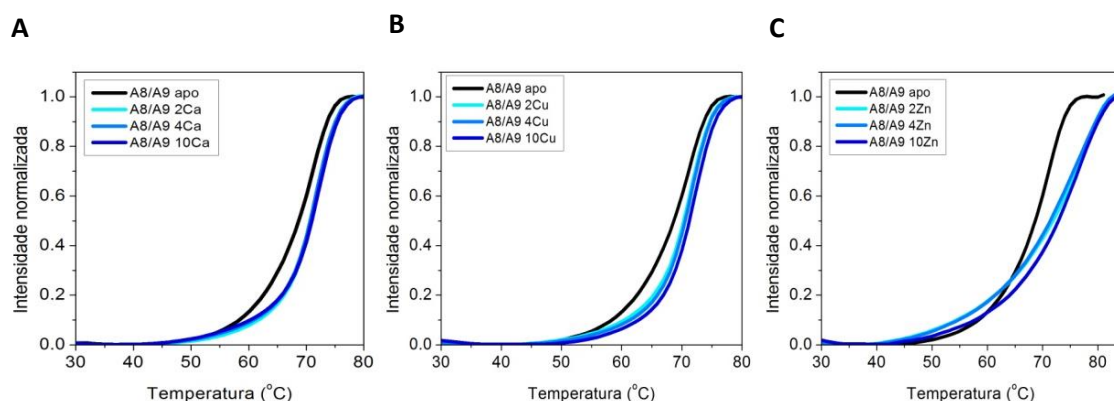


Figura 3.9: Monitorização da desnaturação térmica do heterodímero S100A8/A9 na presença de várias concentrações de íons metálicos, por DSF. A- Desnaturação térmica na presença de cálcio. B- Desnaturação térmica na presença de cobre. C- Desnaturação térmica na presença de zinco.

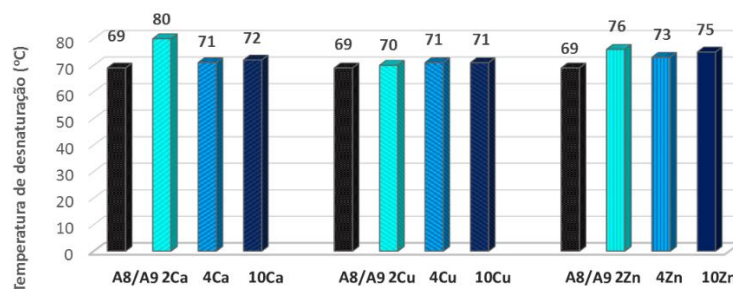


Figura 3.10: Temperaturas de desnaturação do heterodímero S100A8/A9 na presença de várias concentrações dos íons metálicos.

As diferentes concentrações de cálcio e cobre não alteram entre si a estabilidade térmica da S100A8/A9 (Fig. 3.9 – A e B). Comparando o heterodímero ligado a cálcio e a cobre com a S100A8/A9 na forma desmetalada verifica-se que também não há qualquer efeito em termos da estabilidade. Portanto, a ligação de cálcio e cobre à S100A8/A9 não provocam alterações conformacionais que promovam a desnaturação da proteína.

As diferentes concentrações de zinco não alteram entre si a estabilidade térmica da proteína (Fig. 3.9 – C). Comparando a estabilidade térmica entre a apoproteína e a proteína ligada a zinco pode observar-se um ligeiro aumento da estabilidade térmica, no entanto não é significativa. A ligação de zinco à S100A8/A9 provoca ligeiras alterações conformacionais que atrasam a desnaturação da proteína.

A partir destes resultados pode, então, constatar-se que, de um modo geral, os íons metálicos não afetam a estabilidade do heterodímero S100A8/A9. Contudo, entre os três íons metálicos, o zinco parece ter uma pequena influência na estabilidade da S100A8/A9, podendo este afetar mais a conformação do heterodímero e observando a curva de desnaturação, verifica-se um menor declive na presença de zinco, o que pode sugerir a formação uma gama maior de conformações intermédias.

O fato de nenhum metal influenciar a estabilidade da S100A8/A9, sugere que a estrutura do heterodímero é mais resistente às alterações provocadas pela ligação dos íons metálicos do que o homodímero, ou que a ligação destes não induz alterações significativas na conformação, já que mesmo na forma desmetalada o heterodímero é mais estável termodinamicamente do que o homodímero. Estes resultados podem dever-se ao monómero S100A8 que quando interage com o monómero de S100A9 permita uma conformação mais “blindada” à proteína [64]. Pensa-se também que os sítios de ligação de zinco e cobre se encontram entre as subunidades dos dímeros, sendo que deverão ser diferentes do homodímero S100A9, pelo que poderá justificar os diferentes comportamentos em termos de estabilidade [48].

Visto a ligação de um dos metais ao heterodímero não apresentar efeito na estabilidade térmica, seria interessante verificar se a presença de mais do que um íon metálico influencia a

estabilidade. O passo seguinte tratou-se da observação do efeito de dois íons metálicos na estabilidade térmica desta da S100A8/A9, pois esta apresenta locais de ligação diferentes aos três metais, e a ligação de dois dos metais pode provocar alterações conformacionais diferentes do que aquelas que acontecem na presença de apenas um. Os estudos de estabilidade estão demonstrados na figura 3.11.

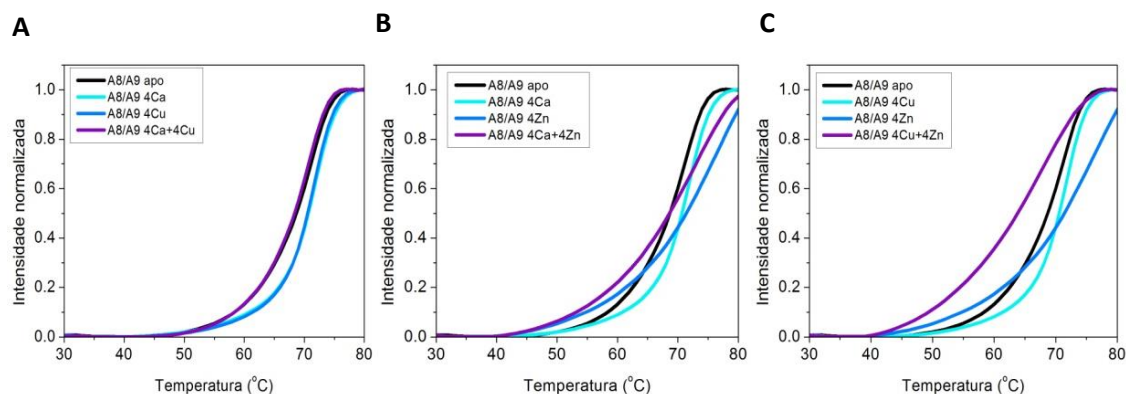


Figura 3.11: Monitorização da desnaturação térmica do heterodímero S100A8/A9 na presença de dois íons metálicos em simultâneo, por DSF. A- Desnaturação térmica do heterodímero na presença de cálcio e cobre (160μM). B- Desnaturação térmica do heterodímero na presença de cobre e zinco (160μM). C- Desnaturação térmica do heterodímero na presença de cálcio e zinco (160μM).

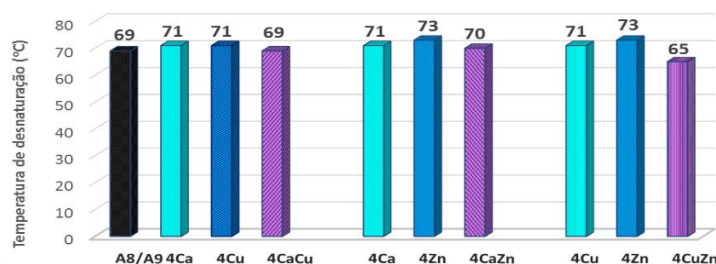


Figura 3.12: Temperaturas de desnaturação da S100A8/A9 na presença de dois íons metálicos em simultâneo.

Os estudos revelam que a estabilidade térmica da proteína S100A8/A9 na presença de dois dos íons metálicos, não é afetada de forma significativa, tal como acontece para a proteína na presença de apenas um dos íons metálicos.

A S100A8/A9 na presença de cálcio e cobre em simultâneo apresenta uma temperatura de desnaturação de 69 °C, na presença de cálcio e zinco de 70 °C, e na presença de cobre e zinco uma temperatura de 65 °C (Fig. 3.12). Comparando estes valores com a temperatura de desnaturação da proteína desmetalada (69 °C), verificamos que mesmo na presença de dois íons metálicos em simultâneo a estabilidade da proteína não é alterada. Apenas se verifica uma pequena diminuição da estabilidade na presença de cobre e zinco em simultâneo, mas que não é considerada significativa.

Em relação à curva de desnaturação pode verificar-se que quando a S100A8/A9 se encontra ligada a zinco (Fig. 3.11 – B e C), o seu declive é menos acentuado, sugerindo uma destabilização diferente, sobrepondo-se ao efeito do cálcio e do cobre. Estes resultados mostram mais uma vez que o zinco parece ser o íon metálico que provoca mais alterações em termos conformacionais e de estabilidade no heterodímero. O heterodímero possui local de ligação a zinco, onde o zinco se liga com grande afinidade, superior à afinidade dos outros íons metálicos, pelo que pode estar associado às atividades anti-micribianas e idutoras de apoptose atribuídas aos heterooligómeros de S100A8/A9, visto ser necessária a sequestração de zinco para estas atividades [64].

Comparando as proteínas S100A9 e S100A8/A9, vemos que têm comportamentos e estabilidades diferentes uma em relação à outra. A interação do monómero de S100A9 com o de S100A8 fornece uma estabilização à subunidade de S100A9, que permite um aumento da área superficial da interface, não exposta, o que está relacionado com a estrutura quaternária do heterodímero ser mais semelhante ao homodímero S100A8 do que ao homodímero S100A9, sendo que os contatos próximos da interface das subunidades da S100A8/A9 são distintos dos da S100A9, sendo mais estáveis.

3.4 Análise da cinética de agregação das proteínas S100A9 e do heterodímero S100A8/A9 em função do tempo

A análise da estabilidade realizada anteriormente evidencia que o homodímero S100A9 é menos estável que o heterodímero S100A8/A9, sendo a exposição de zonas hidrofóbicas mais rápida tanto na presença como ausência de metais. Está descrito que estados conformacionais com estas características têm mais propensão para agregar, visto que o aumento da exposição de zonas hidrofóbicas pode potencializar interações aberrantes [90-91].

Estudos revelam que as proteínas S100 têm sido correntemente encontradas em agregados formados em certas patologias [39]. A agregação proteica está associada a um número variado de doenças degenerativas amilóides, como a doença de Alzheimer, onde a morfologia das espécies agregadas são tipicamente constituídas por folhas- β e fibras [90]. Estas patologias estão normalmente associadas a desregulação dos níveis de íons metálicos e portanto é importante estudar o efeito de metais no processo de agregação [91]. Para tal, foram feitos estudos de agregação, monitorizando a cinética de agregação ao longo do tempo, utilizando o fluoróforo *ThT*, onde é possível obter informações acerca da natureza do núcleo de agregação, a via de agregação dominante e propriedades das proteínas que conduzem à agregação [90]. O fenómeno de agregação proteica, conduzido por um mecanismo de polimerização dependente de nucleação, consiste na formação de fibras amilóides, constituídas por estruturas compostas por folhas- β num arranjo cross- β produzindo agregados insolúveis [92].

Primeiramente avaliou-se o nível de dependência da cinética de agregação em função da concentração. Portanto, começou-se por testar várias concentrações de S100A9 e S100A8/A9, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M e 100 μ M.

Para a S100A9 pôde verificar-se um aumento da intensidade de fluorescência de *ThT* imediato para todas as cinéticas, não apresentado uma curva sigmoidal. Considerou-se a concentração de 40 μ M de S100A9 para prosseguir os estudos, uma vez que as curvas cinéticas se mostraram iguais em todos os ensaios, e sendo que esta concentração se mostrou suficiente, e se encontra dentro das concentrações utilizadas nesta técnica e em estudos semelhantes [78].

Realizaram-se os mesmos ensaios para a S100A8/A9, observou-se que dentro do intervalo de tempo estudado não se verifica um aumento da fluorescência do *ThT*, podendo sugerir que nestas condições o heterodímero S100A8/A9 não produz agregados com reatividade para o *ThT*. Escolheu-se a mesma concentração que a do homodímero S100A9 para prosseguir os estudos, para ser possível uma melhor comparação.

3.4.1 Efeito dos íons metálicos na cinética de agregação do homodímero S100A9

A S100A9 é bastante abundante no cérebro e devido à sua amiloidogénese pode ter um papel importante no desenvolvimento da AD. A compreensão dos mecanismos de ação da S100A9 continua numa fase muito inicial e o seu conhecimento é crítico pois a S100A9 pode ser tanto um fator de risco como um alvo terapêutico para o diagnóstico e tratamento da AD [78].

Em seguimento dos ensaios anteriores, a etapa seguinte foi a de estudar o efeito dos íons metálicos na agregação. É relevante perceber de que forma os íons cálcio, cobre e zinco podem influenciar a cinética de formação amiloide, na medida em que estes íons estão presentes no meio extracelular, podendo estar ou não desregulados, e podem ter um efeito importante na agregação destas proteínas, pelo que a conformação das proteínas pode ser alterada quando ligadas aos íons metálicos.

Analisando as cinéticas de agregação da S100A9 na presença e ausência dos metais sugere-se que se trata de uma agregação heterogénea, observando-se diferentes comportamentos cinéticos, o que sugere a formação de diferentes tipos de agregados. A cinética desta proteína não se comporta como uma curva típica sigmoideal referente à agregação dependente de nucleação e não há uma dependência clara da concentração do íon metálico (Fig. 3.13).

Observa-se que em todas as cinéticas não existe uma fase *lag*, há um aumento da intensidade de fluorescência de *ThT* imediatamente a partir do tempo zero que poderá sugerir a formação de agregados proteicos logo no início da medição, na presença de todos os metais testados e na ausência deles. A ausência desta fase sugere que a S100A9 tem uma elevada propensão para formar agregados a partir da sua conformação solúvel [39].

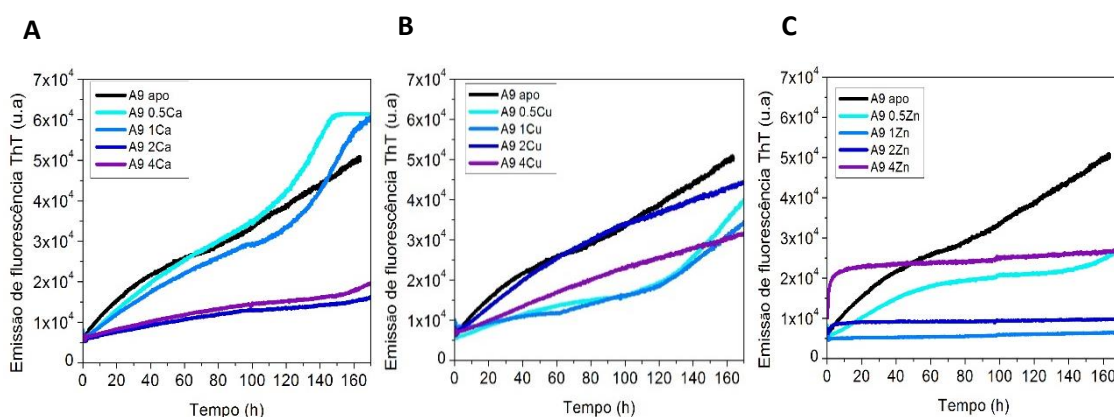


Figura 3.13: Cinéticas de agregação do homodímero S100A9 na presença de várias concentrações dos íons metálicos. A- Cinética de agregação na presença de cálcio. B- Cinética de agregação na presença de cobre. C- Cinética de agregação na presença de zinco

Testou-se inicialmente várias concentrações de cálcio. Observando a figura 3.13 – A, verifica-se que a adição de cálcio afeta a cinética de agregação da S100A9 para concentrações 2 e 4 vezes superiores à de proteína, verificando-se uma diminuição da intensidade de *ThT* sugerindo a

formação de menos agregados ou a alteração da via de agregação para agregados menos reativos ao *ThT*, em comparação com a proteína na forma desmetalada. Maiores concentrações de cálcio podem ser atenuadoras da agregação da S100A9. O comportamento da curva na presença do cálcio mantém-se semelhante à S100A9. Após a primeira reação, observa-se uma segunda reação com características sigmoidais que poderá sugerir um segundo processo de formação de agregados de segunda ordem em que poderá ser dependente da formação de um núcleo de agregação, para a proteína na presença de menores concentrações dos íons metálicos (metade da concentração de proteína) [21].

A presença de cobre não potencia a fibrilação da S100A9. Entre as concentrações de cobre, encontram-se diferentes comportamentos de agregação (Fig.3.13 – B). Para menores concentrações de cobre, observa-se um aumento da intensidade de fluorescência de *ThT* por volta das 120 h, que poderá sugerir uma agregação de segundo grau, a partir dos agregados iniciais. Para as concentrações superiores (2x e 4x) é observado um comportamento exponencial.

A presença de zinco induz a formação de agregados reativos a *ThT* com uma velocidade superior do que a S100A9 na forma desmetalada, no entanto com uma intensidade de fluorescência inferior (Fig. 3.13 – C). O homodímero S100A9 ligado com zinco apresenta um comportamento cinético diferente, observando-se uma curva côncava, onde se observa um crescimento inicial abrupto seguido de equilíbrio, sendo que a intensidade de fluorescência vai aumentando à medida que se aumenta a concentração de zinco. Este tipo de cinética é caracterizada por uma perda de fluorescência de *ThT* lenta ao longo do tempo, começando a partir de um nível alto de ligação inicial. O decaimento da intensidade de fluorescência pode ser explicado pelo rearranjo estrutural dos agregados em diferentes tipos amilóides diminuir o número de sítios de ligação a *ThT*, ou a agregação pode excluir os sítios de ligação do *ThT* do núcleo [39].

Observa-se um comportamento cinético diferente para uma concentração inferior de zinco (metade da concentração da proteína), assemelhando-se ao comportamento da apoproteína, mas com intensidade de fluorescência menor. O zinco parece potenciar de imediato a formação de agregados. A agregação da S100A9 ligada com zinco parece ter um processo de agregação diferente da S100A9 na presença de cálcio ou cobre.

Após os estudos cinéticos com os diferentes íons metálicos separadamente, decidiu-se estudar o efeito da ligação de mais de um metal à S100A9 no mecanismo de formação de agregados proteicos ao longo do tempo, visto que estas proteínas podem não estar apenas em contato com um íon metálico ao executar as suas funções fisiológicas, pelo que é interessante observar as diferenças na agregação quando ligada a mais de um íon ou apenas a um. Realizaram-se os ensaios com concentrações dos íons metálicos em excesso para garantir que todos os sítios de ligação destes íons na proteína tivessem preenchidos.

A figura 3.14 apresenta a cinética de agregação da S100A9 na presença de cálcio e cobre e

cálcio e zinco. Pode observar-se diferentes intensidades de fluorescência *ThT* entre a proteína ligada apenas a um metal e a S100A9 ligada a dois metais, embora adote um comportamento cinético mais semelhante a um dos metais em competição.

É interessante notar que não existem alterações no perfil cinético e intensidade de fluorescência da proteína ligada a dois dos iões quando incubando um dos iões primeiro.

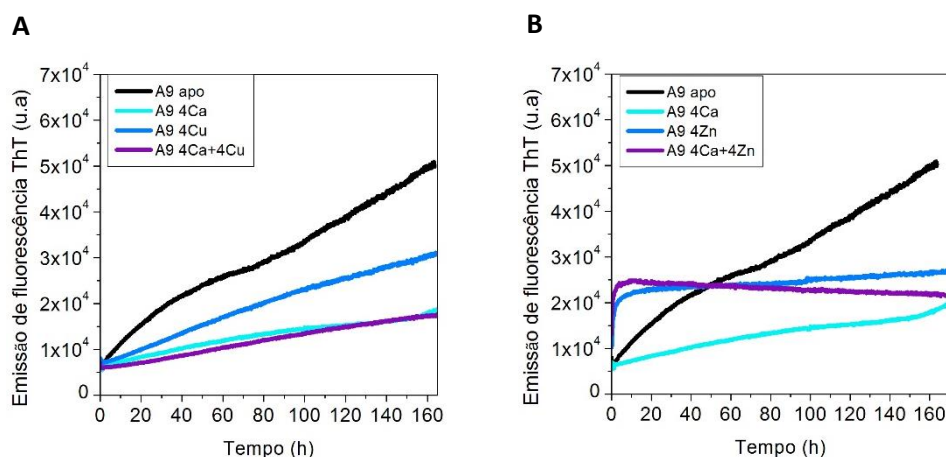


Figura 3.14: Cinética de agregação do homodímero S100A9 na presença de dois iões metálicos em simultâneo. A - Cinética de agregação do homodímero na presença de cálcio e cobre. B - Cinética de agregação do homodímero na presença de cálcio e zinco.

Na figura 3.14 –A observa-se que quando se procede a incubação prévia de cálcio e de seguida é adicionado cobre em excesso, o comportamento assemelha-se ao da proteína ligada a cálcio. Pode constatar-se que o cobre após a ligação de cálcio não influencia a agregação da S100A9, sugerindo que o cálcio tem maior influência na agregação do que o cobre.

Aquando da adição de zinco à S100A9 previamente ligada a cálcio, esta apresenta um comportamento semelhante ao monitorizado para a proteína ligada apenas a zinco. O que sugere que o zinco influencia mais o comportamento cinético da S100A9 em relação ao cálcio (Fig. 3.14 – B).

Na figura 3. 15 encontra-se monitorizada a emissão de fluorescência *ThT* quando a S100A9 é incubada inicialmente com excesso de cobre. A proteína ligada a ambos os iões apresenta um comportamento que se assemelha à S100A9 ligada apenas a um dos metais, sendo a sua intensidade de fluorescência intermédia. Isto pode sugerir que ambos os metais influenciam a formação de agregados, sendo que o cálcio provoca alterações quando a proteína já se encontra ligada a cobre.

Constata-se que a S100A9 ligada a ambos apresenta um comportamento semelhante ao da proteína ligada com excesso de zinco, no entanto com menor intensidade de fluorescência *ThT*. Isto pode sugerir que o zinco tem maior influência na estrutura da S100A9 (Fig. 3.15 – B).

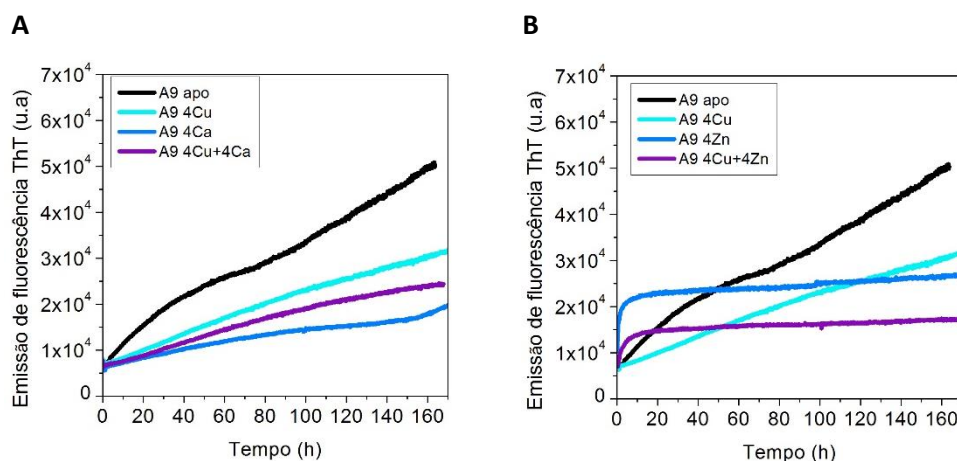


Figura 3.15: Cinética de agregação do homodímero S100A9 na presença de dois íons metálicos em simultâneo. A - Cinética de agregação do homodímero na presença de cobre e cálcio. B - Cinética de agregação do homodímero na presença de cobre e zinco.

Por fim, na figura 3.16 encontra-se a cinética de agregação da S100A9 incubada com excesso de zinco. Observa-se que a adição de cálcio provoca um aumento da intensidade de fluorescência do ThT, contudo a cinética é semelhante à da proteína ligada apenas a zinco. Estes ensaios sugerem que o zinco tem maior influência no comportamento da S100A9.

Comparando a figura 3.16 – A com a figura 3.14 – B observa-se que quando a S100A9 é incubada primeiramente com zinco existe uma maior alteração na intensidade, e portanto pode indicar que o cálcio tem maior influência quando a proteína já se encontra ligada a zinco.

Em relação à figura 3.16 – B, a ligação de cobre à S100A9 diminui a intensidade de fluorescência em contraste a quando se adiciona cálcio. A cinética mantém-se semelhante à S100A9 ligada a zinco, o que pode sugerir que o cobre diminui a formação de agregados reativos a ThT.

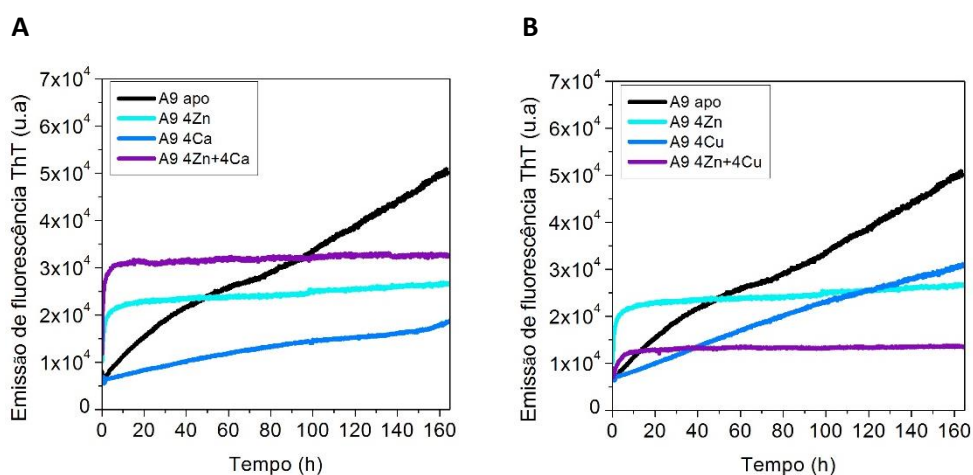


Figura 3.16: Cinética de agregação do homodímero S100A9 na presença de dois íons metálicos em simultâneo. A - Cinética de agregação do homodímero na presença de zinco e cálcio. B - Cinética de agregação do homodímero na presença de zinco e cobre.

Pode concluir-se que o zinco é o íon metálico que mais influencia a cinética de agregação da S100A9, pois na presença deste a S100A9 apresenta uma cinética semelhante a este mesmo na presença dos outros íões, Ca^{2+} e Cu^{2+} . Estes resultados sugerem que a ligação de zinco tem maior efeito na conformação da S100A9, tendo maior influência na formação dos agregados. Este resultado era espectável uma vez que são encontradas quantidades significativas deste íon metálico em depósitos proteicos em diversas doenças neurodegenerativas, como a AD [93].

Em seguimento dos resultados apresentados na secção 3.3.1, era de esperar que os íões metálicos potenciasssem a agregação da S100A9 uma vez que vimos serem destabilizadores da S100A9. Os resultados aqui apresentados não corroboram totalmente essa hipótese, apenas na presença de zinco, onde se observa um aumento imediato da formação de agregados.

3.4.2 Efeito dos íões metálicos na cinética de agregação do heterodímero S100A8/A9

Foram realizados os mesmos ensaios com o heterodímero S100A8/A9, para perceber de que forma os íões metálicos influenciam a formação de agregados desta proteína, visto que esta tem a capacidade ligar cálcio, cobre e zinco, podendo modular a conformação dos agregados formados. Na figura 3.17 encontra-se a monitorização dos ensaios cinéticos de agregação da S100A8/A9 na presença de várias concentrações dos íões metálicos.

As cinéticas de agregação da S100A8/A9 não apresentam um comportamento sigmoidal típico de agregação dependente de nucleação, tal como visto para o homodímero S100A9. Observa-se um aumento imediato pouco acentuado da intensidade de fluorescência do *ThT*, tanto na ausência como na presença dos íões metálicos. O comportamento cinético assemelha-se a uma curva côncava, que sugere a formação de agregados nos tempos iniciais.

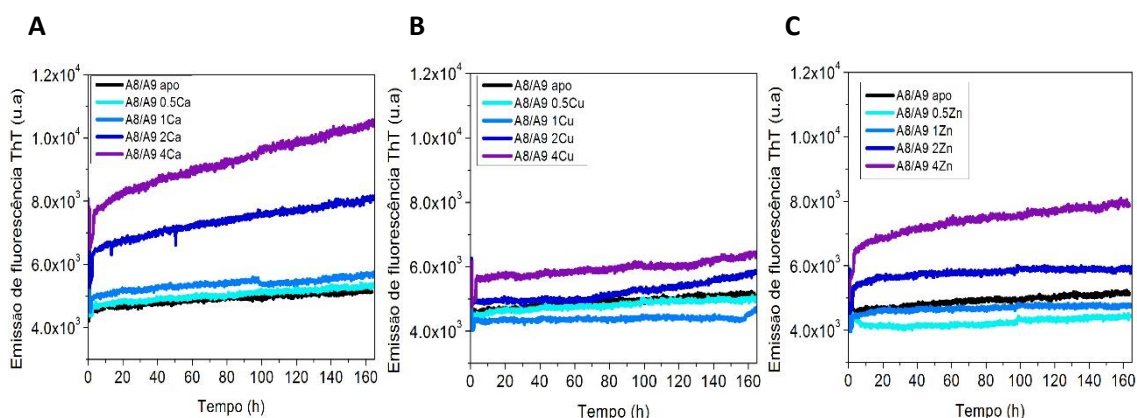


Figura 3.17: Cinética de agregação do heterodímero S100A8/A9 na presença de várias concentrações dos íões metálicos. A- Cinética de agregação na presença de cálcio. B- Cinética de agregação na presença de cobre. C- Cinética de agregação na presença de zinco.

Pela observação da figura 3.17 – A, pode verificar-se que a adição de cálcio não altera o perfil cinético de agregação da proteína. Observa-se um aumento da fluorescência de *ThT* em função do aumento da concentração de cálcio, o que sugere que o cálcio potencia a formação de agregados reativos a *ThT* ou induz alterações conformacionais que ligam mais *ThT*.

A monitorização da cinética de agregação da S100A8/A9 na presença de cobre encontra-se na figura 3.17 – B. Em relação ao heterodímero na forma desmetalada, o ião cobre parece não alterar a cinética de formação amilóide.

Em relação ao heterodímero S100A8/A9 na presença de zinco (Fig. 3.17 – C), não se constata nenhuma alteração no comportamento cinético entre a apoproteína e o heterodímero ligado a zinco. O aumento da concentração de zinco conduz a um ligeiro aumento da emissão de fluorescência de *ThT*, o que sugere que quanto maior a concentração de zinco, maior o número de agregados formados com reatividade para o *ThT*.

O cálcio e o zinco parecem ser os metais que mais rapidamente provocam alterações conformacionais na S100A8/A9, e portanto há uma maior formação de agregados, sendo que o cálcio parece ser maior potenciador da agregação do heterodímero. Estes resultados corroboram com a literatura, onde se afirma que o zinco e o cálcio induzem alterações estruturais no dímero e em alguns casos a atividade biológica destas proteínas é mais regulada pelo zinco do que pelo cálcio [94].

De seguida realizaram-se ensaios de cinética de agregação misturando os diferentes metais, de forma a estudar o efeito de mais de um metal no processo de agregação da S100A8/A9, uma vez que pensa-se que esta proteína tenha diferentes funções consoante os iões metálicos ligados e que a presença de um segundo metal pode inibir o comportamento de outro. Neste ensaio pode observar-se uma mudança de intensidades de fluorescência de *ThT* da S100A8/A9 ligada a dois dos iões metálicos em estudo comparativamente à proteína ligada apenas a um dos metais e também à proteína na forma desmetalada.

Na figura 3.18 encontram-se as cinéticas de agregação da S100A8/A9 previamente incubada com excesso de cálcio antes da adição dos outros metais. A adição de cobre parece não alterar o comportamento cinético da proteína, mas observa-se uma diminuição da intensidade de fluorescência em relação à S100A8/A9 ligada a cálcio apenas (Fig. 3.18 – A), o que pode sugerir que o cobre atenua o efeito do cálcio.

Quando se adiciona zinco observa-se um decréscimo acentuado na intensidade de fluorescência, o que sugere a diminuição de agregados reativos a *ThT*. Como tal, pode existir diminuição de locais específicos para a ligação de *ThT*, sendo que há diminuição de intensidade em relação à S100A8/A9 ligada ao cálcio e ao zinco isoladamente.

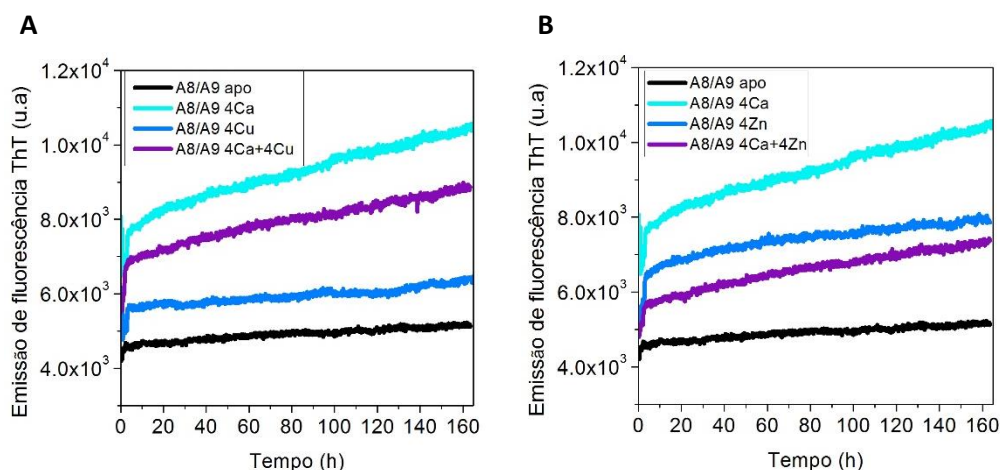


Figura 3.18: Cinética de agregação do heterodímero S100A8/A9 na presença de dois íons metálicos em simultâneo. A - Cinética de agregação do heterodímero na presença de cálcio e cobre. B - Cinética de agregação do heterodímero na presença de cálcio e zinco.

Na figura 3.19 estão representadas as cinéticas de agregação da S100A8/A9 incubada previamente com cobre. Quando se adiciona cálcio o comportamento cinético da S100A8/A9 assemelha-se ao da proteína ligada apenas a cálcio, com intensidades de fluorescência semelhantes (Fig. 3.19 – A). Portanto, o cálcio parece ter uma maior influência do que o cobre na formação de agregados proteicos. Em relação à adição de zinco ao heterodímero ligado com cobre, o comportamento cinético é semelhante ao da S100A8/A9 ligada apenas a zinco. Portanto o cobre parece ser o íon metálico que apresenta menor efeito no processo de agregação.

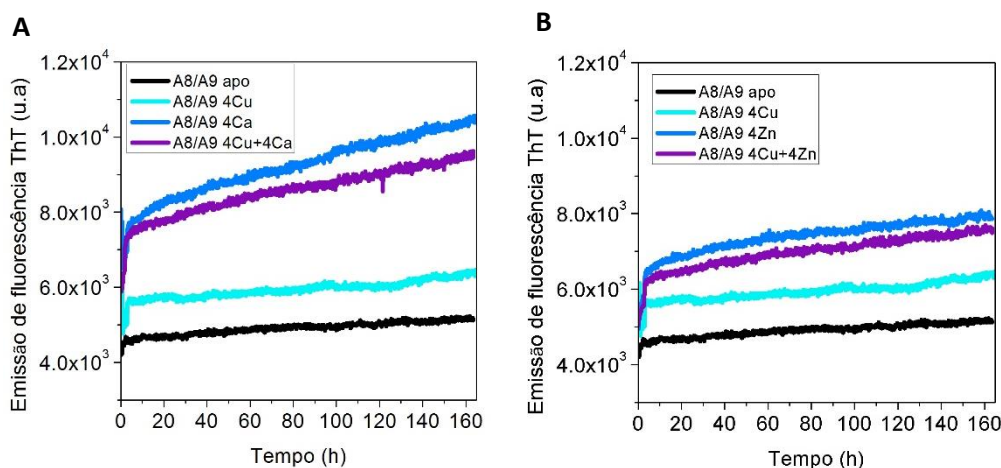


Figura 3.19: Cinética de agregação do heterodímero S100A8/A9 na presença de dois íons metálicos em simultâneo. A - Cinética de agregação do heterodímero na presença de cobre e cálcio. B - Cinética de agregação do heterodímero na presença de cobre e zinco.

Na figura 3.20 está monitorizada a cinética de agregação da S100A8/A9 incubada com excesso de zinco, onde de seguida se adicionou os outros íons metálicos. Na figura 3.20 – A pode constatar-se que a S100A8/A9 ligada a zinco e cálcio apresenta uma cinética semelhante ao heterodímero ligado apenas a cálcio, mas apresenta uma intensidade de fluorescência de ThT

inferior, o que sugere a diminuição de agregados reativos a *ThT*. Comparando com a figura 3.18 – B pode verificar-se que não há alteração na cinética em relação à incubação prévia do cálcio ou do zinco. A presença dos dois metais em simultâneo parece atenuar o efeito potenciador da agregação de ambos.

A cinética do heterodímero S100A8/A9 ligado com zinco e cobre apresenta um comportamento que se assemelha ao da proteína ligada a um dos metais isoladamente, mas com uma intensidade de fluorescência inferior à da proteína ligada a zinco e superior à da proteína ligada a cobre. O cobre parece modificar a conformação da S100A8/A9, diminuindo a formação de estruturas reativas a *ThT*, quando o zinco já se encontra ligado. O heterodímero apresenta uma cinética semelhante à observada na figura 3.19 – B, com intensidade ligeiramente inferior.

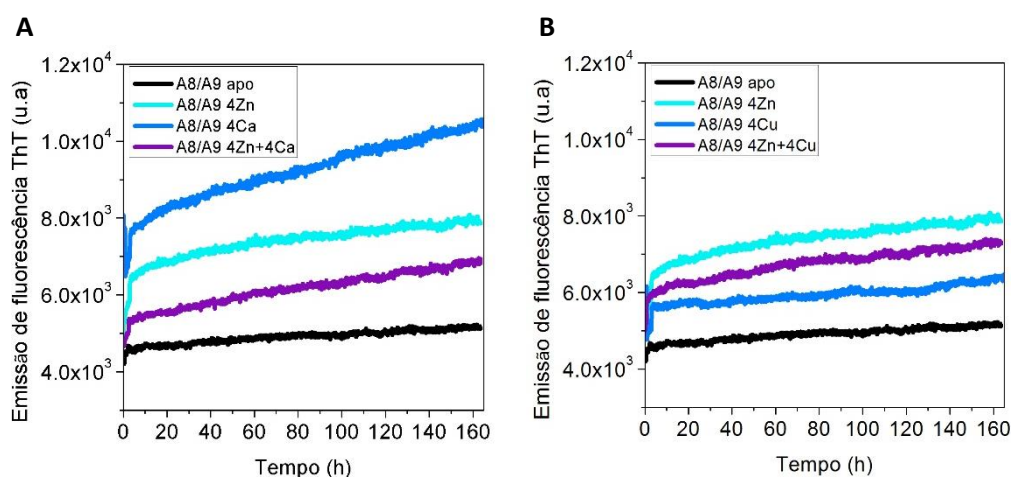


Figura 3.20: Cinética de agregação do heterodímero S100A8/A9 na presença de dois íões metálicos em simultâneo. A - Cinética de agregação do heterodímero na presença de zinco e cálcio. B - Cinética de agregação do heterodímero na presença de zinco e cobre.

É importante notar que há uma maior diferença na intensidade de fluorescência de *ThT* na cinética da S100A8/A9 ligada a zinco e cálcio em simultâneo, apresentando menores valores de intensidade, o que poderá hipoteticamente sugerir uma menor formação de agregados. Comparando a S100A8/A9 ligada a dois metais com a proteína na forma desmetalada constata-se que há sempre maior intensidade de fluorescência de *ThT*, e um crescimento mais acentuado, tanto para a proteína ligada a dois metais como para a proteína em excesso de metais. Estes resultados sugerem que quando o heterodímero se encontra com os locais de ligação de um dos três íões metálicos em estudo todos preenchidos há um potenciamento de agregação, havendo maior formação de agregados proteicos reativos a *ThT*.

Comparando os resultados aqui apresentados com os observados para a estabilidade térmica da S100A8/A9 (secção 3.3.2), esperava-se que os íões metálicos não influenciassem significativamente a agregação da S100A8/A9, uma vez que a ligação dos metais à proteína não alterou a estabilidade e a estabilidade é um dos fatores que influencia a agregação. No entanto,

os ensaios revelaram que os íões metálicos potenciam a formação de agregados do heterodímero.

Tendo em conta estes ensaios constata-se a elevada propensão pra a formação de agregados da S100A8/A9 na presença de cálcio, zinco e cobre, pelo que pode sugerir que no processo de formação de depósitos amilóides, os íões metálicos tenham um papel crucial.

3.5 Efeito do homodímero S100A9 e do heterodímero S100A8/A9 na agregação do péptido A β ₁₋₄₂

O péptido amilóide beta aparece associado a doenças neurodegenerativas, sendo o principal componente de placas amilóides, nomeadamente na AD [97,98, 99]. Como tal, é provável que as proteínas S100 possam influenciar a patologia do A β , uma vez que estas são encontradas em alguns locais em simultâneo com o péptido A β [78]. Portanto decidiu-se estudar o efeito do péptido A β na agregação do homodímero da S100A9 e do heterodímero S100A8/A9.

Monitorizaram-se as cinéticas de agregação do péptido com diferentes concentrações. O péptido A β ₁₋₄₂ apresenta uma curva do tipo sigmoideal, sendo a curva cinética semelhante às obtidas em estudos anteriores [98].

3.5.1 Efeito do homodímero S100A9 na cinética de agregação do péptido A β ₁₋₄₂

A formação amilóide a partir de péptidos é um processo altamente específico. Um vasto número de proteínas humanas são propensas para auto-agregarem-se na forma de fibras amilóides. O *cross seeding* refere-se à habilidade dos agregados de um péptido promoverem a conversão de péptidos solúveis de outro tipo em agregados maduros [99].

Devido à importância do ciclo catalítico na produção de oligómeros de A β ₁₋₄₂, uma estratégia atrativa para prevenir a formação destes conjuntos prejudiciais seria a identificação de inibidores que possam interferir com atividade catalítica das superfícies fibrilares [100]. Neste estudo pretende observar-se o efeito da S100A9 na agregação deste péptido.

O homodímero S100A9 é formado por um empacotamento anti-paralelo de dois monómeros. Por conseguinte, a ligação de péptidos A β às regiões hinge dos dois monómeros fornece a possibilidade de empacotamento anti-paralelo [81]. Como a formação amilóide é dependente da concentração, dependendo do rácio de concentração de S100A9 e A β ₁₋₄₂, um deles pode ser mais propenso para agregar formando agregados termodinamicamente estáveis mais rapidamente do que o outro.

Primeiramente monitorizou-se a cinética de agregação da S100A9 na presença de diferentes concentrações de A β ₁₋₄₂. A figura 3.21 mostra a cinética de agregação do homodímero S100A9 quando se adiciona diferentes concentrações de A β ₁₋₄₂ (10 e 20%).

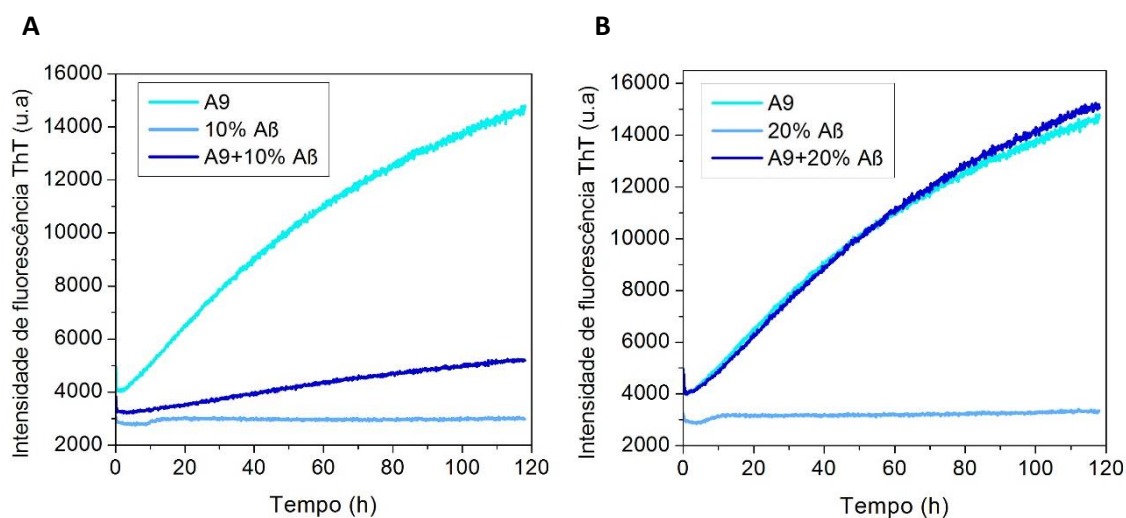


Figura 3.21: **Cinéticas de agregação do homodímero S100A9 na presença do péptido Aβ₁₋₄₂.** A- Cinética de agregação do homodímero S100A9 na presença de 2μM de Aβ₁₋₄₂. B- Cinética de agregação do homodímero S100A9 na presença de 4μM de Aβ₁₋₄₂.

A adição de baixas concentrações de Aβ₁₋₄₂ parece alterar o comportamento de agregação da S100A9, sugerindo a participação e co-agregação das duas proteínas. Com a concentração de 10% observa-se uma curva cinética com menor intensidade de *ThT* relativamente à S100A9 e uma ligeira alteração do perfil cinético da S100A9 (Fig. 3.21 – A), mas com uma concentração de 20% de Aβ₁₋₄₂ parece não haver alterações no perfil cinético de agregação (Fig. 3.22 – B), o que pode sugerir que concentrações mais baixas do péptido podem atenuar o efeito de agregação da S100A9. No entanto verifica-se um aumento da formação de agregados reativos a *ThT* de 10% para 20% de Aβ₁₋₄₂.

Na literatura é possível encontrar que para concentrações superiores a 5μM de Aβ₁₋₄₂ há um aumento da formação de agregados após 24h na presença de S100A9 [78]. Estes dados podem corroborar com os obtidos, uma vez que se observa um aumento significativo na formação de agregados reativos a *ThT* da S100A9 com Aβ₁₋₄₂ relativamente ao péptido Aβ₁₋₄₂.

3.5.2 Efeito do heterodímero S100A8/A9 na cinética de agregação do péptido Aβ₁₋₄₂

A elevada capacidade de formação amiloide da S100A8/A9 pode levar à sua deposição amiloide em algumas doenças, caracterizada pela sua expressão elevada, mostrando uma importância patológica, pelo que é necessário uma investigação aprofundada dos mecanismos de agregação desta proteína.

Na figura 3.22 estão representadas as cinéticas de *cross seeding* da S100A8/A9 e A β ₁₋₄₂. Em relação ao heterodímero S100A8/A9, a adição de 10% de A β ₁₋₄₂ (2 μ M) não influencia a cinética de agregação da S100A8/A9 (Fig. 3.22 – A). Contudo 20% de A β ₁₋₄₂ induz um aumento de intensidade de *ThT* que poderá sugerir que o A β ₁₋₄₂ poderá recrutar a S100A8/A9 para a formação de agregados reativos a *ThT* e sugerindo que o A β ₁₋₄₂ potencia a agregação da S100A8/A9 (Fig. 3.22 - B).

O péptido A β ₁₋₄₂ parece influenciar o perfil cinético da S100A8/A9, passando de um comportamento semelhante a uma cinética do tipo côncava, para uma curva sigmoidal sendo que se verifica um segundo crescimento a partir das 20h (Fig. 3.22 – B). Estes resultados podem sugerir que quando existe a interação da S100A8/A9 com uma certa quantidade de A β ₁₋₄₂ há uma maior propensão para a formação de agregados com afinidade para o *ThT*. Portanto fica a hipótese do heterodímero ser potenciador da agregação do péptido A β .

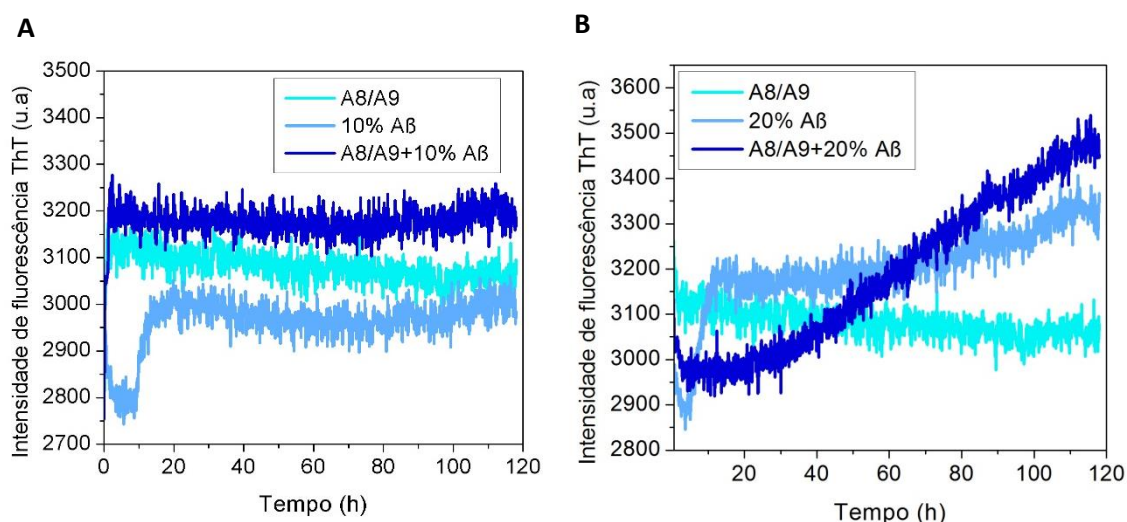


Figura 3.22: Cinéticas de agregação do heterodímero S100A8/A9 na presença do péptido A β ₁₋₄₂. A- Cinética de agregação do heterodímero S100A8/A9 na presença de 2 μ M de A β ₁₋₄₂. B- Cinética de agregação do heterodímero S100A8/A9 na presença de 4 μ M de A β ₁₋₄₂.

Este estudo não se encontra completo, sendo que no futuro pretende-se estudar outros aspetos, como o efeito de outras concentrações de A β ₁₋₄₂, para avaliar o nível de dependência da cinética de agregação da S100A9 e S100A8/A9 em função da concentração de A β ₁₋₄₂, estudos de estabilidade e conformacionais de modo a elucidar acerca das interações entre estas proteínas e o péptido e também analisar a morfologia dos agregados formados.

IV. CONCLUSÕES

A presença de depósitos proteicos no cérebro é uma característica comum a várias doenças neurodegenerativas [28]. É relevante estudar fatores que possam afetar a estabilidade das proteínas presentes nestes agregados e consequentemente influenciem a agregação, uma vez que os mecanismos envolvidos no processo da deposição de agregados proteicos continuam desconhecidos.

Em algumas doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, é possível encontrar as proteínas S100A9 e S100A8 em depósitos proteicos. Em casos de inflamação, a forma dimérica da S100A9 é o estado conformacional desta proteína segregado preferencialmente e a presença da proteína S100A8 é normalmente encontrada associada à S100A9 na forma de heterocomplexo [101]. É portanto relevante estudar o mecanismo de agregação destas proteínas e perceber de que forma podem influenciar a agregação do péptido A β ₁₋₄₂, o principal constituinte das placas amilóides encontrado na doença de Alzheimer [97].

Os estudos de estabilidade na presença de metais são importantes uma vez que muitas patologias estão associadas à desregulação de íons metálicos e a associação a estes pode modificar a conformação da proteína. Os estudos de estabilidade térmica foram realizados tanto na presença como na ausência de três íons metálicos, cálcio, cobre e zinco, visto que tanto a proteína S100A9 como a S100A8/A9 possuem locais de ligação a estes metais [83]. Os resultados apresentados revelam que a S100A8/A9 é termodinamente mais estável que a S100A9 tanto na ausência como na presença de qualquer um dos metais, podendo justificar a maior quantidade de S100A9 encontrada em depósitos proteicos em comparação com o heterodímero [54]. O monómero de S100A8 confere uma maior estabilidade à subunidade de S100A9, sugerindo que os contatos entre as duas subunidades são distintos do homodímero S100A9, permitindo uma conformação mais blindada para a S100A8/A9 do que para o homodímero S100A9.

Os três íons metálicos, Ca²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺, revelaram modular a estabilidade térmica do homodímero S100A9 de forma destabilizadora, promovendo a exposição das regiões hidrofóbicas da mesma a menores temperaturas, visto que o que confere maior estabilidade ao homodímero é o seu *core* hidrofóbico [54]. A presença de dois dos metais em simultâneo permitiu testar se as modificações conformacionais na proteína eram significativamente diferentes do que as provocadas apenas para um metal e se a estabilidade era afetada de forma diferente. A ligação de dois metais não mostrou afetar a estabilidade térmica da proteína, o que pode indicar que quando a S100A9 possui todos os locais de ligação aos íons metálicos ocupados pode sofrer alterações conformacionais mas que mantêm o núcleo hidrofóbico blindado. Em simultâneo o cálcio e o cobre estabilizam a proteína, aumentando a sua temperatura de desnaturação. As curvas de desnaturação da S100A9 desmetalada e da S100A9 na presença de metais sugerem

mecanismos de desnaturação diferentes, revelando que na presença de íões metálicos parece haver um processo de desnaturação de dois estados [85].

A estabilidade térmica da S100A8/A9 não parece ser afetada por nenhum dos íões metálicos na gama estudada (concentração de 0,5 a 4 vezes superior à de proteína). A presença de dois íões metálicos também não parece afetar de forma significativa a estabilidade térmica do heterodímero, o que sugere que a estrutura do heterodímero é mais resistente às alterações provocadas pela ligação dos íões metálicos do que o homodímero, já que mesmo na forma desmetalada o heterodímero termodinamicamente mais estável. Estudos afirmam que os sítos de ligação a cobre e zinco encontram-se na interface das duas subunidades, pelo que devem diferir do homodímero para o heterodímero e como tal pode explicar as diferentes estabilidades das duas proteínas na presença destes íões metálicos. Os ensaios monitorizados na presença de zinco são mais heterogêneos, o que pode indicar que o zinco apresenta uma maior influência na estabilidade da S100A8/A9. Estes resultados corroboram com estudos anteriores que afirmam que a atividade da S100A8/A9 está fortemente relacionada com a sequestração de zinco [83].

A outra vertente do trabalho destinava-se ao estudo cinético de formação de agregados da S100A9 e S100A8/A9 a fim de averiguar o efeito de possíveis moduladores de agregação. A cinética de agregação da S100A9 não apresenta um comportamento típico sigmoidal, apresentando uma cinética mais semelhante a uma curva côncava, sem se verificar uma fase *lag*. O heterodímero S100A8/A9 também apresenta um comportamento que se assemelha a uma curva côncava, com um crescimento elevado a partir do tempo inicial seguido de equilíbrio.

A presença dos íões metálicos, cálcio, cobre e zinco, sugere que se trata de uma agregação heterogênea, constatando-se diferentes perfis cinéticos para a agregação da S100A9, revelando a formação de diferentes tipos de agregados. O cálcio e o cobre não mostraram potenciar a agregação da S100A9. O comportamento cinético da S100A9 na presença de zinco parece diferente em relação à presença dos outros íões metálicos, apresentando uma curva côncava com elevada formação de agregados reativos a *ThT* no início do ensaio. Este comportamento cinético assemelha-se ao monitorizado para o heterodímero S100A8/A9.

As cinéticas da S100A8/A9 apresentadas na presença dos íões metálicos também não são cinéticas típicas de agregação dependente de nucleação. Os ensaios revelam que o cálcio, o cobre e o zinco potenciam a formação de agregados reativos a *ThT*, ao contrário do que se sucede com a S100A9. Portanto, estes íões metálicos parecem ter um papel importante na agregação da S100A8/A9. Para um estudo mais completo pretendia-se averiguar a morfologia dos agregados, oligómeros ou fibras, por dot blot, e analisar a toxicidade dos mesmos.

Como um dos objetivos deste trabalho seria perceber de que forma estas proteínas S100 influenciam a agregação do péptido A β ₁₋₄₂, realizaram-se ensaios cinéticos da agregação da S100A9 e da S100A8/A9 com o A β ₁₋₄₂. A presença do péptido A β ₁₋₄₂ parece afetar o comportamento de agregação da S100A9, sugerindo a participação e co-agregação das duas

proteínas. A co-agregação do heterodímero S100A8/A9 com o péptido A β ₁₋₄₂ parece modificar o comportamento cinético da S100A8/A9, verificando-se um comportamento do tipo sigmoidal, com uma fase *lag* superior à monitorizada para o A β ₁₋₄₂. O aumento da formação de agregados reativos a *ThT*, sugere que o A β ₁₋₄₂ pode recrutar a S100A8/A9, potenciando a sua agregação. Se se confirmar estes resultados, pode-se sugerir que a S100A8/A9 esteja envolvida na agregação da A β ₁₋₄₂ e possa ter um papel significativo na formação de depósitos amilóides. Estes ensaios foram pouco replicados, pelo que são apenas exploratórios e encontram-se numa fase muito inicial. O trabalho futuro seria o estudo da co-agregação da S100A9 e da S100A8/A9 com o A β ₁₋₄₂ na presença de outras concentrações de A β ₁₋₄₂, para avaliar o nível de dependência de concentração. No futuro pretende-se estudar também o efeito dos iões metálicos no processo de agregação das mesmas, visto estes poderem estar desregulados em doenças neurodegenerativas e poderem ter um potencial papel na agregação da A β ₁₋₄₂.

Com este trabalho, podemos concluir assim que o homodímero S100A9 e o heterodímero S100A8/A9 têm comportamentos bastantes distintos. Em termos de estabilidade térmica a S100A8/A9 é bastante mais estável, sendo que mesmo na presença de iões metálicos a sua estabilidade não se altera. Ambas as proteínas revelam propensão para formar agregados, sendo essa influenciada pelos iões cálcio, cobre e zinco. Os iões metálicos revelaram potenciar a agregação das duas proteínas, pelo que pensa-se que estes são moduladores de agregação da S100A9 e da S100A8/A9, tendo um papel fundamental no processo de agregação.

V. BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Xing-Lai and S.-Q. Liu, "Thinking into Mechanism of Protein Folding and Molecular Binding," vol. 293, no. 30860011, 2011.
- [2] J. M. Yon, "Protein folding: Concepts and perspectives," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 53, no. 7, pp. 557–567, 1997.
- [3] M. Stefani and C. M. Dobson, "Protein aggregation and aggregate toxicity: New insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution," *J. Mol. Med.*, vol. 81, no. 11, pp. 678–699, 2003.
- [4] J. King, C. Haase-Pettingell, and D. Gossard, "Protein folding and misfolding," *Am. Sci.*, vol. 90, no. 5, pp. 445–453, 2002.
- [5] C. M. Dobson, "Protein folding and its links with human disease.," *Biochem. Soc. Symp.*, no. 68, pp. 1–26, 2001.
- [6] S. B. O. Ken A. Dill, M. S. Shell, and T. R. Weikl, "The protein folding problem," *Changes*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [7] F. Richards and T. Richmond, "Protein Structure," *Mol. Interact. Act. ...*, vol. 8, 2009.
- [8] S. S. Leal, H. M. Botelho, and C. M. Gomes, "Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 256, no. 19–20, pp. 2253–2270, 2012.
- [9] C. L. Brooks, J. N. Onuchic, and D. J. Wales, "Statistical thermodynamics. Taking a walk on a landscape.," *Science*, vol. 293, no. 5530, pp. 612–613, 2001.
- [10] a R. Dinner, a Sali, L. J. Smith, C. M. Dobson, and M. Karplus, "Understanding protein folding via free energy surfaces from theory and experiment," *Tibs*, vol. 25, no. July, pp. 331–339, 2000.
- [11] F. U. Hartl, A. Bracher, and M. Hayer-Hartl, "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis.," *Nature*, vol. 475, no. 7356, pp. 324–332, 2011.
- [12] F. U. Hartl, "Molecular chaperones in cellular protein folding.," *Nature*, vol. 381, no. 6583, pp. 571–579, 1996.
- [13] T. R. Jahn and S. E. Radford, "Folding versus aggregation: Polypeptide conformations on competing pathways," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 469, no. 1, pp. 100–117, 2008.
- [14] P. Maiti, J. Manna, S. Veleri, and S. Frautschy, "Molecular Chaperone Dysfunction in Neurodegenerative Diseases and Effects of Curcumin," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–14, 2014.
- [15] M. S. Hipp, S. H. Park, and F. U. Hartl, "Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases," *Trends Cell Biol.*, vol. 24, no. 9, pp. 506–514, 2014.
- [16] F. Bemporad and F. Chiti, "Protein misfolded oligomers: Experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationships," *Chem. Biol.*, vol. 19, no. 3, pp. 315–327, 2012.
- [17] F. Chiti and C. M. Dobson, "Protein misfolding, functional amyloid, and human disease.,"

Annu. Rev. Biochem., vol. 75, pp. 333–366, 2006.

- [18] F. Hane and Z. Leonenko, “Effect of Metals on Kinetic Pathways of Amyloid- β Aggregation,” *Biomolecules*, vol. 4, no. 1, pp. 101–16, 2014.
- [19] T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo, and C. M. Dobson, “The amyloid state and its association with protein misfolding diseases,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 6, pp. 384–96, 2014.
- [20] R. Linding, J. Schymkowitz, F. Rousseau, F. Diella, and L. Serrano, “A comparative study of the relationship between protein structure and α -aggregation in globular and intrinsically disordered proteins,” *J. Mol. Biol.*, vol. 342, no. 1, pp. 345–353, 2004.
- [21] S. I. Cohen, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, and T. P. J. Knowles, “From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation,” *J. Mol. Biol.*, vol. 421, no. 2–3, pp. 160–171, 2012.
- [22] C. a Ross and M. a Poirier, “Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration?,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 11, pp. 891–898, 2005.
- [23] A. H. Becker, E. Oh, J. S. Weissman, G. Kramer, and B. Bukau, “Selective ribosome profiling as a tool for studying the interaction of chaperones and targeting factors with nascent polypeptide chains and ribosomes,” *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 11, pp. 2212–39, 2013.
- [24] F. H. Niesen, H. Berglund, and M. Vedadi, “The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability,” *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 9, pp. 2212–2221, 2007.
- [25] C. a Ross and M. a Poirier, “Protein aggregation and neurodegenerative disease,” *Nat. Med.*, vol. 10 Suppl, no. July, pp. S10–S17, 2004.
- [26] D. Ruzafa, B. Morel, L. Varela, A. I. Azuaga, and F. Conejero-Lara, “Characterization of Oligomers of Heterogeneous Size as Precursors of Amyloid Fibril Nucleation of an SH3 Domain: An Experimental Kinetics Study,” *PLoS One*, vol. 7, no. 11, 2012.
- [27] D. J. Selkoe, “Alzheimer ’ s Disease : Genes , Proteins , and Therapy,” *Perspective*, vol. 81, no. 2, pp. 741–767, 2001.
- [28] S. Treusch, D. M. Cyr, and S. Lindquist, “Amyloid deposits,” vol. 8, no. 11, 2009.
- [29] L. a. Munishkina and A. L. Fink, “Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1768, no. 8, pp. 1862–1885, 2007.
- [30] M. R. Eftink, “The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins,” *Biochemistry. (Mosc.)*, vol. 63, no. 3, pp. 276–284, 1998.
- [31] N. Greenfield, “Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure,” *Nat Protoc.*, vol. 1, no. 6, pp. 2876–2890, 2007.
- [32] A. Hawe, M. Sutter, and W. Jiskoot, “Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization,” *Pharm. Res.*, vol. 25, no. 7, pp. 1487–1499, 2008.
- [33] G. a Senisterra and P. J. Finerty, “High throughput methods of assessing protein stability and aggregation,” *Mol. Biosyst.*, vol. 5, no. 3, pp. 217–223, 2009.
- [34] U. B. Ericsson, B. M. Hallberg, G. T. DeTitta, N. Dekker, and P. Nordlund, “Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies,” *Anal.*

Biochem., vol. 357, no. 2, pp. 289–298, 2006.

- [35] M. Lindgren and P. Hammarström, “Amyloid oligomers: Spectroscopic characterization of amyloidogenic protein states,” *FEBS J.*, vol. 277, no. 6, pp. 1380–1388, 2010.
- [36] R. Donato, B. R. Cannon, G. Sorci, F. Riuzzi, K. Hsu, D. J. Weber, and C. L. Geczy, “Functions of S100 proteins.,” *Curr. Mol. Med.*, vol. 13, no. 1, pp. 24–57, 2013.
- [37] S. Ghavami, I. Rashedi, B. M. Dattilo, M. Eshraghi, W. J. Chazin, M. Hashemi, S. Wesselborg, C. Kerkhoff, and M. Los, “S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway.,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 83, no. 6, pp. 1484–1492, 2008.
- [38] G. Fritz, H. M. Botelho, L. a. Morozova-Roche, and C. M. Gomes, “Natural and amyloid self-assembly of S100 proteins: Structural basis of functional diversity,” *FEBS J.*, vol. 277, no. 22, pp. 4578–4590, 2010.
- [39] S. B. Carvalho, H. M. Botelho, S. S. Leal, I. Cardoso, G. Fritz, and C. M. Gomes, “Intrinsically Disordered and Aggregation Prone Regions Underlie β -Aggregation in S100 Proteins,” *PLoS One*, vol. 8, no. 10, pp. 1–11, 2013.
- [40] C. W. Heizmann, “3D structures of the calcium and zinc binding S100 proteins,” *Handb. Met.*, vol. 6, no. Vol. 4, pp. 183–194, 2011.
- [41] A. Hermani, B. De Servi, S. Medunjanin, P. a. Tessier, and D. Mayer, “S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF- κ B signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells,” *Exp. Cell Res.*, vol. 312, no. 2, pp. 184–197, 2006.
- [42] V. N. Uversky and Y. Lyubchenko, *Bio-Nanoimaging : Protein Misfolding & Aggregation*. 2014.
- [43] Raghunatha R. Yammani, “S100 proteins in cartilage: Role in arthritis,” *Changes*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [44] C. Pröpper, X. Huang, J. Roth, C. Sorg, and W. Nacken, “Analysis of the MRP8-MRP14 protein-protein interaction by the two- hybrid system suggests a prominent role of the C-terminal domain of S100 proteins in dimer formation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 1, pp. 183–188, 1999.
- [45] R. Donato, “S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 33, no. 7, pp. 637–668, 2001.
- [46] L. H. Gomes, M. J. Raftery, W. X. Yan, J. D. Goyette, P. S. Thomas, and C. L. Geczy, “S100A8 and S100A9-oxidant scavengers in inflammation.,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 58, pp. 170–86, 2013.
- [47] T. E. Kehl-Fie and E. P. Skaar, “Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 14, no. 2, pp. 218–224, 2010.
- [48] T. Vogl, A. L. Gharibyan, and L. a. Morozova-Roche, “Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: Self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 3, pp. 2893–2917, 2012.
- [49] H. Zreiqat, D. Belluoccio, M. M. Smith, R. Wilson, L. a Rowley, K. Jones, Y. Ramaswamy, T. Vogl, J. Roth, J. F. Bateman, and C. B. Little, “S100A8 and S100A9 in experimental osteoarthritis.,” *Arthritis Res. Ther.*, vol. 12, no. 1, p. R16, 2010.

- [50] M. J. Hunter and W. J. Chazin, "High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 20, pp. 12427–12435, 1998.
- [51] K. Ishikawa, A. Nakagawa, I. Tanaka, M. Suzuki, and J. Nishihira, "The structure of human MRP8, a member of the S100 calcium-binding protein family, by MAD phasing at 1.9 Å resolution," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 56, no. 5, pp. 559–566, 2000.
- [52] J. Markowitz and W. E. Carson III, "Review of S100A9 biology and its role in cancer," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [53] A. Cesaro, N. Anceriz, A. Plante, N. Pagé, M. R. Tardif, and P. a. Tessier, "An Inflammation Loop Orchestrated by S100A9 and Calprotectin Is Critical for Development of Arthritis," *PLoS One*, vol. 7, no. 9, 2012.
- [54] H. Itou, M. Yao, I. Fujita, N. Watanabe, M. Suzuki, J. Nishihira, and I. Tanaka, "The crystal structure of human MRP14 (S100A9), a Ca(2+)-dependent regulator protein in inflammatory process," *J. Mol. Biol.*, vol. 316, no. 2, pp. 265–276, 2002.
- [55] E. Eremenko, A. Ben-Zvi, L. a. Morozova-Roche, and D. Raveh, "Aggregation of Human S100A8 and S100A9 Amyloidogenic Proteins Perturbs Proteostasis in a Yeast Model," *PLoS One*, vol. 8, no. 3, pp. 1–14, 2013.
- [56] T. E. Kehl-Fie, S. Chitayat, M. I. Hood, S. Damo, N. Restrepo, C. Garcia, K. a. Munro, W. J. Chazin, and E. P. Skaar, "Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of *Staphylococcus aureus*," *Cell Host Microbe*, vol. 10, no. 2, pp. 158–164, 2011.
- [57] R. a. Newton and N. Hogg, "The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils," *J. Immunol.*, vol. 160, no. 3, pp. 1427–1435, 1998.
- [58] J. M. Ehrchen, C. Sunderkötter, D. Foell, T. Vogl, and J. Roth, "The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 86, no. 3, pp. 557–566, 2009.
- [59] J. Roth, T. Vogl, C. Sorg, and C. Sunderkötter, "Phagocyte-specific S100 proteins: A novel group of proinflammatory molecules," *Trends Immunol.*, vol. 24, no. 4, pp. 155–158, 2003.
- [60] M. Riva, Z. He, E. Källberg, F. Ivars, and T. Leanderson, "Human S100A9 Protein Is Stabilized by Inflammatory Stimuli via the Formation of Proteolytically-Resistant Homodimers," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, 2013.
- [61] G. Srikrishna, "S100A8 and S100A9: New insights into their roles in malignancy," *J. Innate Immun.*, vol. 4, no. 1, pp. 31–40, 2011.
- [62] A. Manuscript, "NIH Public Access," *Changes*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [63] C. Kerkhoff, M. Klempt, and C. Sorg, "Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9)," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1448, no. 2, pp. 200–211, 1998.
- [64] I. P. Korndörfer, F. Brueckner, and A. Skerra, "The Crystal Structure of the Human (S100A8/S100A9)₂ Heterotetramer, Calprotectin, Illustrates how Conformational Changes of Interacting α -Helices Can Determine Specific Association of Two EF-hand Proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 370, no. 5, pp. 887–898, 2007.
- [65] W. Nacken, J. Roth, C. Sorg, and C. Kerkhoff, "S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity," *Microsc. Res. Tech.*,

vol. 60, no. 6, pp. 569–580, 2003.

- [66] S. Yui, Y. Nakatani, M. J. Hunter, W. J. Chazin, and M. Yamazaki, "Implication of extracellular zinc exclusion by recombinant human calprotectin (MRP8 and MRP14) from target cells in its apoptosis-inducing activity.," *Mediators Inflamm.*, vol. 11, no. 3, pp. 165–172, 2002.
- [67] H. Y. Sroussi, Y. Lu, D. Villines, and Y. Sun, "The down regulation of neutrophil oxidative metabolism by S100A8 and S100A9: Implication of the protease-activated receptor-2," *Mol Immunol.*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [68] C. Ryckman, K. Vandal, P. Rouleau, M. Talbot, and P. a Tessier, "Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion.," *J. Immunol.*, vol. 170, no. 6, pp. 3233–3242, 2003.
- [69] W. R. Swindell, A. Johnston, X. Xing, A. Little, P. Robichaud, J. J. Voorhees, G. Fisher, and J. E. Gudjonsson, "Robust shifts in S100a9 expression with aging: a novel mechanism for chronic inflammation.," *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 1215, 2013.
- [70] L. N. Zhao, L. Lu, L. Y. Chew, and Y. Mu, "Alzheimer's disease-A panorama glimpse," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 7, pp. 12631–12650, 2014.
- [71] A. Rauk, "The chemistry of Alzheimer's disease.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 9, pp. 2698–2715, 2009.
- [72] T. Jiang, R. C.-C. Chang, H. Rosenmann, and J.-T. Yu, "Advances in Alzheimer's Disease: From Bench to Bedside," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–2, 2015.
- [73] D. J. Selkoe, "Alzheimer's disease is a synaptic failure.," *Science*, vol. 298, no. 5594, pp. 789–791, 2002.
- [74] K. Jordan-Sciutto and R. Bowser, "Alzheimer s disease and brain development: common molecular pathways," *Changes*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [75] G. G. Nils Norlin, Magnus Hellberg, Andrei Filippov, Alioscka A. Sousa and and O. N. A. Richard D. Leapman, Nils Almqvist, "Aggregation and Fibril Morphology of the Arctic Mutation of Alzheimer's A β peptide by CD, TEM, STEM and in situ AFM," *Changes*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [76] D. M. Walsh, E. Thulin, A. M. Minogue, N. Gustavsson, E. Pang, D. B. Teplow, and S. Linse, "A facile method for expression and purification of the Alzheimer's disease-associated amyloid β -peptide," *FEBS J.*, vol. 276, no. 5, pp. 1266–1281, 2009.
- [77] S. L. Shammash, G. a. Garcia, S. Kumar, M. Kjaergaard, M. H. Horrocks, N. Shivji, E. Mandelkow, T. P. J. Knowles, E. Mandelkow, and D. Klenerman, "A mechanistic model of tau amyloid aggregation based on direct observation of oligomers," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 7025, 2015.
- [78] C. Wang, A. G. Klechikov, A. L. Gharibyan, S. K. T. S. Wärmländer, J. Jarvet, L. Zhao, X. Jia, S. K. Shankar, A. Olofsson, T. Brännström, Y. Mu, A. Gräslund, and L. a. Morozova-Roche, "The role of pro-inflammatory S100A9 in Alzheimer's disease amyloid-neuroinflammatory cascade," *Acta Neuropathol.*, vol. 127, no. 4, pp. 507–522, 2014.
- [79] E. O. Lee, J. H. Yang, K.-A. Chang, Y.-H. Suh, and Y. H. Chong, "Amyloid- β peptide-induced extracellular S100A9 depletion is associated with decrease of antimicrobial peptide activity in human THP-1 monocytes.," *J. Neuroinflammation*, vol. 10, no. 1, p. 68, 2013.

- [80] F. Kametani, "S100A9 / Mrp14 Plays an Important Role in A β Amyloidosis Enhancement," vol. 1, no. 2, pp. 9–11, 2014.
- [81] C. Zhang, Y. Liu, J. Giltthorpe, and J. R. C. van der Maarel, "MRP14 (S100A9) protein interacts with Alzheimer beta-amyloid peptide and induces its fibrillization," *PLoS One*, vol. 7, no. 3, pp. 2–8, 2012.
- [82] H. J. Kim, K. a. Chang, T. Y. Ha, J. Kim, S. Ha, K. Y. Shin, C. Moon, W. Nacken, H. S. Kim, and Y. H. Suh, "S100A9 knockout decreases the memory impairment and neuropathology in crossbreed mice of Tg2576 and S100A9 knockout mice model," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, pp. 1–9, 2014.
- [83] T. Vogl, N. Leukert, K. Barczyk, K. Strupat, and J. Roth, "Biophysical characterization of S100A8 and S100A9 in the absence and presence of bivalent cations," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1763, no. 11, pp. 1298–1306, 2006.
- [84] L. Wang, H. Luo, X. Chen, Y. Jiang, and Q. Huang, "Functional characterization of S100A8 and S100A9 in altering monolayer permeability of human umbilical endothelial cells," *PLoS One*, vol. 9, no. 3, pp. 1–13, 2014.
- [85] K. Kuwajima, "The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure.,", *Proteins*, vol. 6, no. 2, pp. 87–103, 1989.
- [86] a V Finkelstein and E. I. Shakhnovich, "Theory of cooperative transitions in protein molecules. II. Phase diagram for a protein molecule in solution.,", *Biopolymers*, vol. 28, no. 10, pp. 1681–1694, 1989.
- [87] M. H. Hao and H. a Scheraga, "Molecular mechanisms for cooperative folding of proteins.,", *J. Mol. Biol.*, vol. 277, no. 4, pp. 973–983, 1998.
- [88] C. M. Dobson, "Protein misfolding, evolution and disease," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 24, no. 9, pp. 329–332, 1999.
- [89] A. L. Fink, "Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies and amyloid," *Fold. Des.*, vol. 3, no. 1, pp. 9–23, 1998.
- [90] J. P. Bernacki and R. M. Murphy, "Model discrimination and mechanistic interpretation of kinetic data in protein aggregation studies," *Biophys. J.*, vol. 96, no. 7, pp. 2871–2887, 2009.
- [91] J. R. Cannon and J. T. Greenamyre, "The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases," *Toxicol. Sci.*, vol. 124, no. 2, pp. 225–250, 2011.
- [92] J. A. Vázquez, "Modeling of chemical inhibition from amyloid protein aggregation kinetics.,", *BMC Pharmacol. Toxicol.*, vol. 15, no. 1, p. 9, 2014.
- [93] N. Rezaei-Ghaleh, K. Giller, S. Becker, and M. Zweckstetter, "Effect of zinc binding on ??-amyloid structure and dynamics: Implications for A?? aggregation," *Biophys. J.*, vol. 101, no. 5, pp. 1202–1211, 2011.
- [94] C. Kerkhoff, T. Vogl, W. Nacken, C. Sopalla, and C. Sorg, "Zinc binding reverses the calcium-induced arachidonic acid-binding capacity of the S100A8/A9 protein complex," *FEBS Lett.*, vol. 460, no. 1, pp. 134–138, 1999.
- [95] a. V. Maltsev, S. Bystryak, and O. V. Galzitskaya, "The role of ??-amyloid peptide in neurodegenerative diseases," *Ageing Res. Rev.*, vol. 10, no. 4, pp. 440–452, 2011.

- [96] L. Gu and Z. Guo, "Alzheimer's A β 42 and A β 40 peptides form interlaced amyloid fibrils," *J. Neurochem.*, vol. 126, no. 3, pp. 305–311, 2013.
- [97] G. Meisl, X. Yang, E. Hellstrand, B. Frohm, J. B. Kirkegaard, S. I. a Cohen, C. M. Dobson, S. Linse, and T. P. J. Knowles, "Differences in nucleation behavior underlie the contrasting aggregation kinetics of the A β 40 and A β 42 peptides.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 26, pp. 9384–9, 2014.
- [98] P. Hortschansky, V. Schroeckh, T. Christopeit, G. Zandomenoghi, and M. Fändrich, "The aggregation kinetics of Alzheimer ' s b-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation," *Protein Sci.*, vol. 14, pp. 1753–1759, 2005.
- [99] R. Cukalevski, X. Yang, G. Meisl, U. Weininger, K. Bernfur, B. Frohm, T. P. J. Knowles, and S. Linse, "The A β 40 and A β 42 peptides self-assemble into separate homomolecular fibrils in binary mixtures but cross-react during primary nucleation," *Chem. Sci.*, vol. 6, no. 7, pp. 4215–4233, 2015.
- [100] S. I. a Cohen, P. Arosio, J. Presto, F. R. Kurudenkandy, H. Biverstål, L. Dolfe, C. Dunning, X. Yang, B. Frohm, M. Vendruscolo, J. Johansson, C. M. Dobson, A. Fisahn, T. P. J. Knowles, and S. Linse, "A molecular chaperone breaks the catalytic cycle that generates toxic A β oligomers," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, no. August 2014, 2015.
- [101] K. Yanamandra, O. Alexeyev, V. Zamotin, V. Srivastava, A. Shchukarev, A.-C. Brorsson, G. G. Tartaglia, T. Vogl, R. Kayed, G. Wingsle, J. Olsson, C. M. Dobson, A. Bergh, F. Elgh, and L. A. Morozova-Roche, "Amyloid formation by the pro-inflammatory S100A8/A9 proteins in the ageing prostate.," *PLoS One*, vol. 4, no. 5, p. e5562, Jan. 2009.

VI. ANEXOS

Anexo I

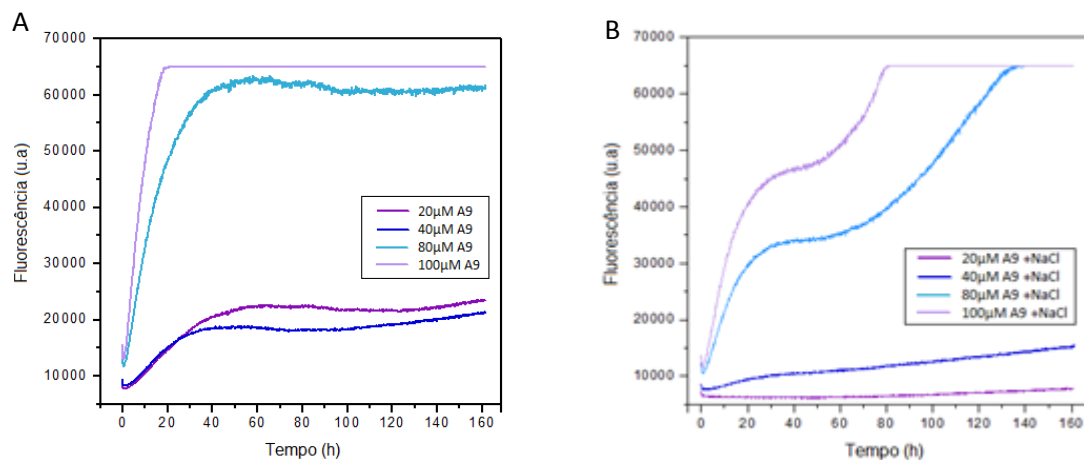


Figura 6.1: Cinética de agregação do homodímero S100A9, com várias concentrações. A - Cinética de agregação do homodímero S100A9, sem adição de sal. B - Cinética de agregação do homodímero S100A9, com adição de NaCl. A roxo a proteína a uma concentração de 20 μM , a azul escuro a 40 μM , a azul a 80 μM , e a lilás a 100 μM .

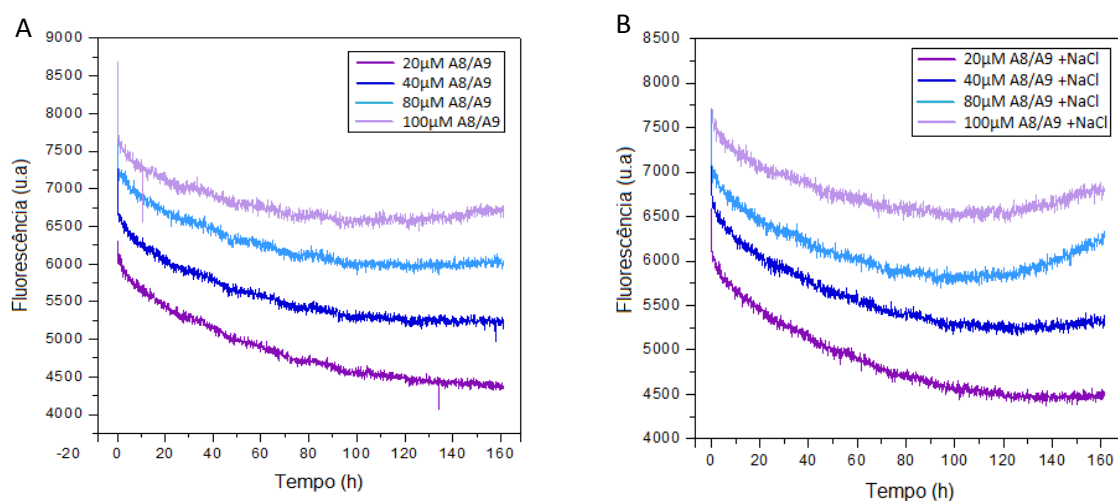


Figura 6.2: Cinética de agregação do heterodímero S100A8/A9, com várias concentrações. A - Cinética de agregação do heterodímero, sem adição de sal. B - Cinética de agregação do heterodímero, com adição de NaCl. A roxo a proteína a uma concentração de 20 μM , a azul escuro a 40 μM , a azul a 80 μM , e a lilás a 100 μM .